

N° d'ordre :

THÈSE

présentée à la
Faculté des Sciences de l'Université de Paris

pour obtenir

Le Grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

Bernard CROIZAT

SUJET de la THESE : Les acides biliaires au cours de la vie embryonnaire
et néonatale : étude in vivo et in vitro.

Soutenue le 3 Juillet 1970 devant la commission d'examen

M. CHAPEVILLE.....Président

MM. JACQUOT.....
PICON.....

} Examineurs

HARARY.....Invité

PARIS 1970

THÈSE

présentée à la
Faculté des Sciences de l'Université de Paris

pour obtenir

Le Grade de Docteur ès Sciences Naturelles

par

Bernard CROIZAT

SUJET de la THESE : Les acides biliaires au cours de la vie embryonnaire
et néonatale : étude in vivo et in vitro.

Soutenue le 3 Juillet 1970 devant la commission d'examen

M. CHAPEVILLE.....Président

MM. JACQUOT.....
PICON.....

} Examineurs

HARARY.....Invité

PARIS 1970



Ce travail a été effectué au Centre de Recherches sur la Nutrition du C.N.R.S. à Bellevue. Je ne saurais trouver les mots justes pour exprimer ma profonde gratitude à son Directeur Monsieur R. JACQUOT. Je n'oublie pas son accueil à Bellevue, sa sollicitude généreuse et amicale lors d'une grave décision personnelle et de mon entrée au C.N.R.S. et tout ce que cette thèse doit à son esprit de clarté et de rigueur. Qu'il soit bien convaincu de ma reconnaissance et de mon affection.

Monsieur le Professeur CHAPEVILLE m'a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse. Depuis plusieurs années déjà, il me témoigne son intérêt. Qu'il soit assuré de ma gratitude.

Monsieur le Professeur PICON a bien voulu faire partie de mon jury. Je le remercie bien vivement de l'attention avec laquelle il a lu, discuté et corrigé mon manuscrit. J'ai fait le plus grand profit de nos entretiens au cours desquels il m'a réservé le meilleur accueil.

Je suis très honoré que Monsieur le Professeur HARARY ait accepté de siéger dans mon jury. Je le remercie très sincèrement pour ses conseils judicieux et amicaux au cours d'une année où j'ai eu le plaisir de travailler à ses côtés.

Il m'est un devoir très agréable d'exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur PASCAUD qui depuis la fin de ma scolarité me témoigne, par ses conseils et sa bienveillante critique, l'intérêt le plus vif. Je suis très sensible à l'accueil amical et compréhensif qu'il m'a toujours réservé.

Je voudrais également manifester ma reconnaissance à Monsieur M. LAMBIOTTE, Maître de Recherches au C.N.R.S, sous la direction duquel je travaille. Par son aide et ses conseils il a très largement contribué à cette thèse.

Que Monsieur J. KANDE et Madame N. SIMONET trouvent ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour la collaboration précieuse qu'ils n'ont jamais manqué de m'accorder. Que Monsieur et Madame ROBIN soient également remerciés.

Madame S. SEIGE s'est chargée de la présentation matérielle de ce travail avec sa compétence et sa diligence habituelles. Je rends grâce à sa gentillesse qui nous a fait oublier le caractère ingrat de cette tâche.

Je remercie également Madame S. FINEL.

*

* *

*

INTRODUCTION -

=====

- PREMIERE PARTIE -

LES ACIDES BILIAIRES AU COURS DE LA VIE EMBRYONNAIRE ET NEONATALE : ETUDE IN VIVO

1)- MATERIEL ET TECHNIQUES -

- Matériel animal.
- Acides biliaires.
- Techniques d'extraction du cholestérol et des acides biliaires.
- Techniques de détection et de dosage.
- Conjugaison in ovo de l'acide cholique à la taurine: détermination des activités enzymatiques.
- Techniques isotopiques.

2)- RESULTATS EXPERIMENTAUX -

- Date d'apparition, nature et évolution des acides biliaires.
- Evolution du cholestérol total hépatique du foetus de lapin et de l'embryon de poulet.
- Origine des acides biliaires.
- Conjugaison de l'acide cholique à la taurine au cours du développement embryonnaire du poulet

3)- DISCUSSION -

- Date d'apparition des acides biliaires.
- Augmentation prénatale des acides biliaires.
- Conséquence du passage transplacentaire des acides biliaires.
- Date d'apparition de la conjugaison in ovo chez l'embryon de poulet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549922_0054

- DEUXIEME PARTIE -

ETUDE IN VITRO

1)- MATERIEL ET TECHNIQUES -

- Matériel animal.
- Techniques de cultures
 - cultures organotypiques de foie embryonnaire de poulet
 - cultures cellulaires.

2)- RESULTATS EXPERIMENTAUX -

- Cultures organotypiques.
- Cultures cellulaires
 - cellules hépatiques d'embryons de poulet
 - cellules hépatiques de mammifères.

3)- DISCUSSION -

- Discussion générale et perspectives.

=====

- BIBLIOGRAPHIE -

=====

Les acides et alcools biliaires constituent le produit majeur du catabolisme du noyau stérolique de l'animal adulte (1, 2). Cette notion, établie dans le cas des Mammifères et de l'Oiseau, semble confirmée chez le Batracien, le Reptile et le Poisson. Les acides cholique, chénodesoxycholique et désoxycholique, conjugués à la taurine ou à la glycine (Fig.n°1) sous forme de sels représentent l'élément organique principal de la bile des Vertébrés supérieurs.

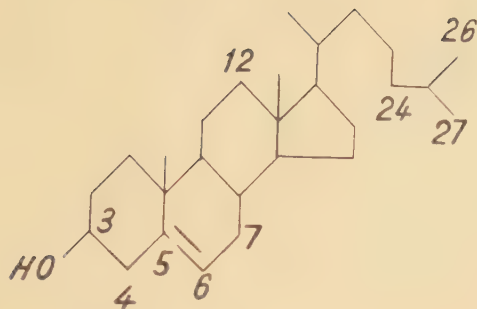
- FIGURE n° 1 -

De nombreux travaux, depuis l'emploi des isotopes, mettent en évidence la formation des acides biliaires à partir du cholestérol. Plutôt que d'en dresser un catalogue fastidieux, nous nous contenterons de faire le point des données actuelles. D'après BERGSTROM et DANIELSSON (1) la transformation du cholestérol en acide cholique s'opère essentiellement suivant le schéma (Fig.n°2)

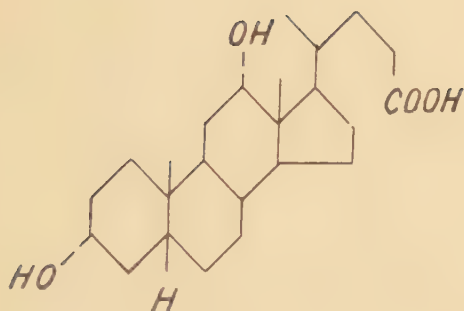
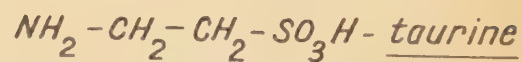
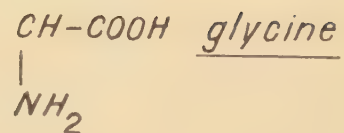
- FIGURE n° 2 -

cholestérol $\longrightarrow$ cholest-5-ène-3 β . 7 α -diol $\longrightarrow$ 7 α -hydroxyxycholest-4-en-3-one $\longrightarrow$ 7 α ,12 α -dihydroxycholest-4-en-3-one $\longrightarrow$ 7 α ,12 α -dihydroxy-5 β -cholestan-3-one $\longrightarrow$ 5 β -cholestan-3 α ,7 α ,12 α -triol $\longrightarrow$ acide cholique.

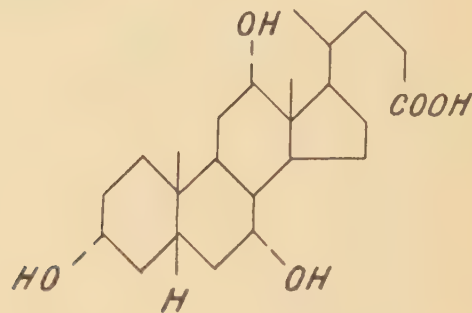
Le 5 β cholestan 3 α ,7 α ,12 α triol est converti en acide cholique par β oxydation. Le mode de formation de l'acide chénodésoxycholique est analogue (Fig. N°2): la présence des cholest 5ène 3 β 7 α diol, 7 α hydroxycholest 4-en-3-one, et 7 α hydroxy 5 β cholestan-3-one intermédiaires a été démontrée dans les homogénats de foie de cobaye dont l'acide biliaire principal est l'acide chénodésoxycholique. Ces deux acides biliaires représentant le terme



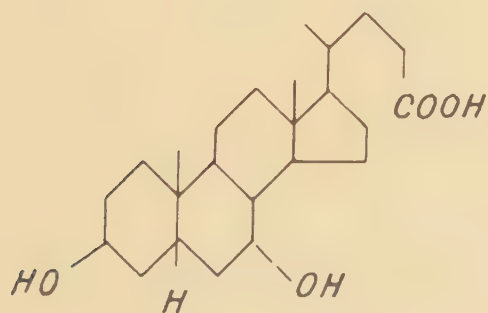
Cholestérol



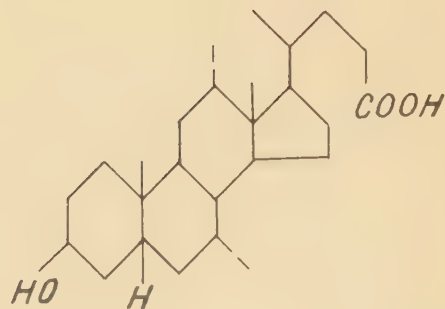
acide désoxycholique



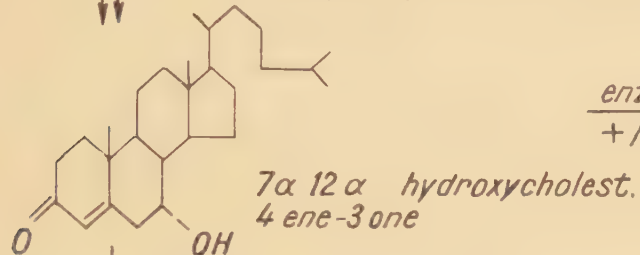
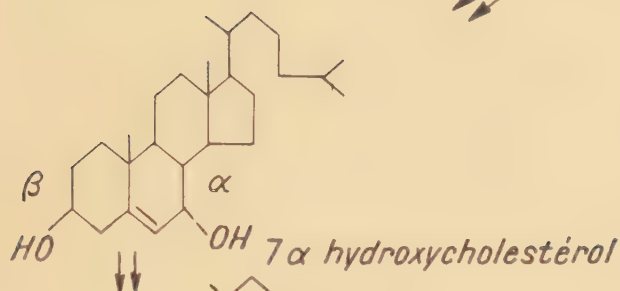
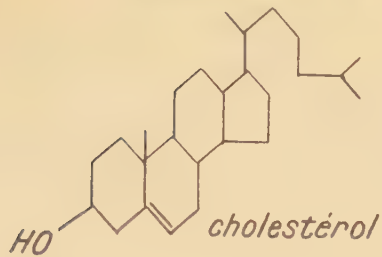
acide cholique



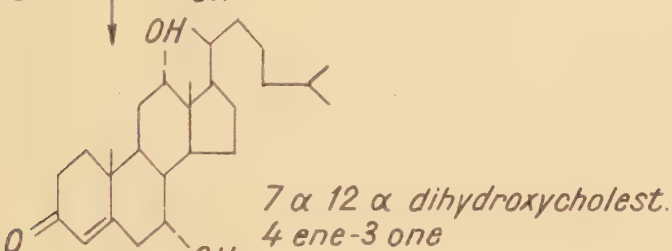
acide chénodésoxycholique



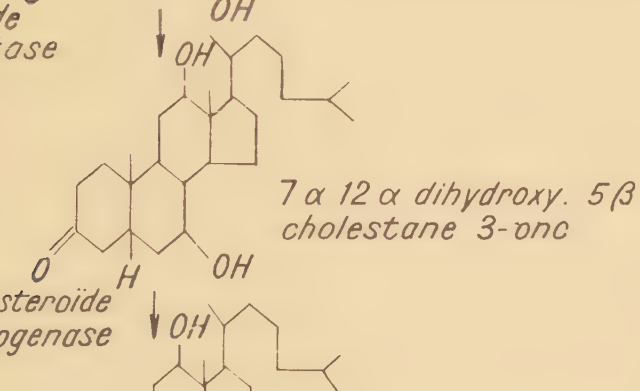
acide Lithocholique



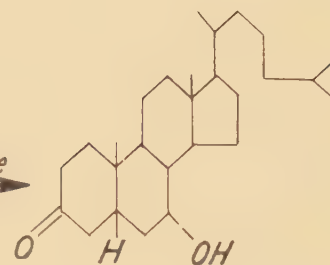
5β stéroïde
reductase



3 hydroxystéroïde
deshydrogenase

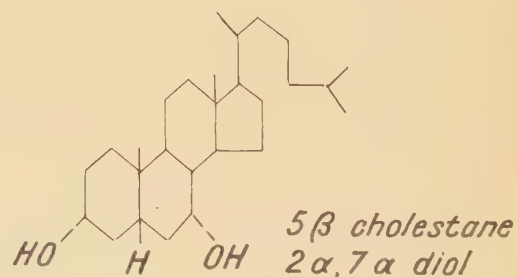


enzyme soluble
+ NADPH⁺



(foie de cobaye)

enzyme soluble + NADPH⁺



ultime du catabolisme du cholestérol et leur formation implique deux voies métaboliques analogues mais distinctes à partir du 7 β hydroxy-cholest 4-en-3-one, sans interconversion des produits finaux.

La formation du 5 β -cholestane-3 α ,7 α -diol et du 5 β -cholestane-3 α ,7 α ,12 α -triol à partir des 7 α -hydroxycholest-4-en-3-one et 7 α , 12 α -dihydroxycholest-4-en-3-one, est catalysée par deux enzymes solubles, la 5 β -stéroïde réductase et la 3 α -hydroxystéroïde deshydrogénase. Ces deux enzymes ont été purifiées à partir du foie de rat. La 5 β -stéroïde réductase catalyse la réduction de la double liaison en C4 des Δ^4 céto stéroïdes et la 3 hydroxystéroïde réductase deshydrogénase, celle des groupes 3 céto. Ces deux enzymes requièrent la présence de N.A.D.P.H.

BJORKHEM (2) confirme le rôle des Δ^4 3 α hydroxy-stérols dans la biosynthèse des acides biliaires. Après injection i.p. de 3 β H³- 4¹⁴C-cholest 4ène 3 α ,7 α diol et 5 β cholestane 3 α ,7 α ,12 α triol à des rats pourvus d'une fistule biliaire, il constate, par détermination du rapport H³/C¹⁴, que plus de 90p.100 du tritium est perdu lors de la conversion du cholest-4-ène 3 α ,7 α ,12 α triol en acide cholique (l'oxydation due à la perte du tritium intervenant avant la saturation de la double liaison) contre moins de 25 p.100 pour les deux stérols saturés. Ainsi, prédomine la formation intermédiaire de Δ^4 3 céto stéroïdes dans la conversion du

4 cholesténol en acide cholique. Le cholest 4 ene 3 α ,7 α diol ne parait pas un intermédiaire important dans la transformation du cholestérol en acides biliaires. DANIELSSON et BJORKHEM (3) étudiant l'oxydation préalable en Δ^4 3 céto stéroïdes du Δ^4 cholestérol, mettent en évidence dans la fraction microsomiale du foie de rat des Δ^4 3 hydroxy- stéroïde-deshydrogénases actives sur les 3 α et 3 β hydroxy-en présence de NAD et NADP.

Les dernières réactions du catabolisme du cholestérol portent sur la dégradation de la chaîne latérale qui perd ses trois derniers atomes de carbone. Des travaux déjà anciens ont situé les systèmes enzymatiques responsables de ces décarboxylations au niveau des mitochondries.

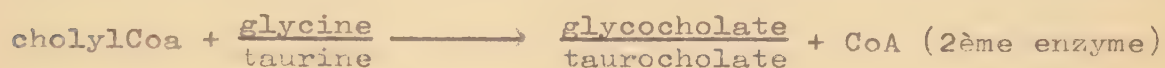
Nous avons indiqué plus haut les trois acides biliaires principaux des mammifères. Selon les espèces on les rencontre simultanément ou non en des proportions variables. Les caractéristiques de répartition dépendent des particularités métaboliques propres à l'animal et de l'action éventuelle de sa flore microbienne.

Ainsi, les acides cholique et chénodesoxycholique sont des acides biliaires primaires synthétisés de novo par le foie alors que l'acide désoxycholique est un produit de transformation de l'acide cholique par la flore intestinale; il existe chez le rat, une hydroxylase hépatique qui transforme l'acide désoxycholique résorbé en acide cholique. Cette activité enzymatique est absente chez le lapin dont la bile contient surtout de l'acide désoxycholique.

Les 3 acides biliaires principaux sont présents chez l'homme, mais seuls les acides cholique et désoxycholique sont trouvés chez le chien. Les acides cholique et chénodésoxycholique prédominent chez le rat, les acides désoxycholique et cholique chez le lapin. On remarque chez le porc la présence d'acides biliaires particuliers, 3,6,12 trihydroxylés (hyocholique) et 3,6 déhydroxylés (hyodésoxycholique). Chez le poulet enfin, les acides chénodésoxycholique et cholique prédominent. Le mode de conjugaison de ces acides biliaires varie également selon les espèces comme nous le verrons plus loin.

Conjugaison des acides biliaires -

Les acides biliaires de la bile normale ne sont pas libres mais conjugués à la glycine ou à la taurine (Fig.n°1). La conjugaison de l'acide cholique, par exemple, résulte de deux réactions :



De nombreux auteurs ont étudié la conjugaison in vitro. Dès 1954 BERGSTROM et GLOOR(4) obtiennent des acides taurodésoxycholique et taurocholique marqués en incubant des coupes ou des homogénats de foie de rat avec de l'acide désoxycholique marqué. Avec des homogénats de foie humain(5), ils trouvent 60p.100 d'acide taurocholique et 40 p.100 d'acide glycocholique. L'addition de taurine augmente la proportion de tauroconjugués obtenus.

En 1956, BREMER (6) étudiant le mécanisme de la conjugaison dans la fraction microsomiale du foie de rat, note le rôle de l'ATP, du CoA, de divers ions, de la cystéine et du glutathion.

Plus récemment enfin, SCHERSTEN (7) met en évidence l'effet stimulant d'une fraction lysosomiale ("L fraction") obtenue par centrifugation différentielle, sur la synthèse des acides biliaires conjugués par les microsomes. Ce facteur stimulant pourrait être identifié à l'acyl-transférase, enzyme(s) qui transfère(nt) le groupe acyl de l'acide biliaire activé par les microsomes à la taurine ou à la glycine pendant la formation du conjugué final.

L'étude de la répartition du type de conjugaison dans l'échelle zoologique montre que la conjugaison à la glycine semble

se cantonner aux mammifères. Mais chez bon nombre de ceux-ci coexistent acides biliaires conjugués à la taurine et conjugués à la glycine, sans que la prédominance d'un type sur l'autre puisse être rattaché ni au groupe auquel appartient l'animal ni à son type d'alimentation.(8).

On trouve uniquement des acides biliaires tauroconjugués chez le poulet et des acides biliaires glycoconjugués chez le lapin. La bile du rat contient 9 fois plus de tauroconjugués que de conjugués à la glycine; la proportion de ces deux types de conjugaison est inversée chez l'homme adulte et chez le porc.

Le foie est capable de conjuguer rapidement et d'excréter des quantités importantes d'acides biliaires. 20 mg d'acide lithocholique injectés intrapéritonéalement, ce qui représente le double de la quantité d'acides biliaires présent dans le cycle entéro-hépatique du rat, sont totalement excrétés sous forme conjuguée. Après injection intrapéritonéale de 2 à 4 mg d'acides biliaires marqués à des rats porteurs de fistule, plus des 2/3 de l'isotope apparaissent dans la bile dans les trois heures qui suivent. L'acide biliaire injecté et ses métabolites apparaissent conjugués à la taurine avec 1 à 2 p.100 de conjugués à la glycine(9).

Action de la flore -

On sait que des microorganismes, dont certains sont des hotes habituels de l'intestin, peuvent modifier diversement la molécule des acides biliaires, l'oxydant ou la réduisant. C'est ce qui explique la grande diversité des substances fécales provenant des acides biliaires.

Par un traitement antibiotique bref et intense, on peut stériliser le contenu intestinal du rat. L'élimination de la flore

digestive empêche alors la dégradation des acides biliaires. NORMAN (10,11), administrant en injection intrapéritonéale de l'acide cholique -24¹⁴C à des rats ingérant un mélange de terramycine et de phtalylsulfonazol, voit que la majeure partie de la radioactivité excrétée se trouve dans l'acide cholique des fèces sans qu'il y ait eu dégradation sensible de cette substance. LAMBIOTTE (12) montre également qu'on trouve après traitement par les antibiotiques de l'acide cholique, libre ou conjugué, dans les fèces. GUSTAFSSON (13), utilisant des rats "germ-free" suit le sort de l'acide cholique marqué administré per os. Cet acide se retrouve dans les fèces sous forme de tauroconjugué.

La conversion de l'acide cholique en acide désoxycholique dans l'intestin du lapin et du rat (14) constitue l'action la plus manifeste de la flore intestinale. Rappelons chez ce dernier, la présence d'une 7 α hydroxylase hépatique qui reconvertit la quasi-totalité de cet acide en acide cholique. L'acide hyocholique est également réduit en acide hyodésoxycholique dans l'intestin du porc.

Cycle entéro-hépatique et régulation de la synthèse des acides biliaires -

Les acides biliaires synthétisés et conjugués par le foie sont excrétés dans la bile et passent dans l'intestin grêle après un séjour et une concentration éventuels dans la vésicule. Il semble que les cellules hépatiques soient incapables de stocker les acides biliaires.

Le cycle entéro-hépatique a été décrit dès la fin du 19ème siècle. En 1955, SJOWALL (15) après injection intrapéritonéale d'acides biliaires marqués chez le rat, ne retrouve pas d'activité dans la circulation périphérique et seulement des quantités

négligeables dans la lymphe intestinale. Chez cet animal, dépourvu de vésicule biliaire, les acides biliaires se répartissent entre le foie, les canaux biliaires, l'intestin grêle et la circulation portale.

Chez le rat, la quantité d'acides biliaires présents à un moment donné dans la lumière de l'intestin grêle ne semble pas varier systématiquement avec l'état digestif. C'est une conséquence du cycle entéro-hépatique. A une résorption intestinale active répond une excrétion hépatique continuelle des acides biliaires résorbés qui sont renvoyés au foie par le système porte. Ce va et vient émousse les à coups éventuels de leur néoformation. D'une part la quantité d'acides biliaires nouvellement formée à chaque instant est petite par rapport à celle qui revient au foie par la veine porte. D'autre part, la dégradation du cholestérol semble sous la dépendance de la quantité d'acides biliaires qui arrivent continuellement au foie (16). L'augmentation du cholestérol hépatique et du cholestérol sérique sous l'effet d'une administration orale de taurocholate ne s'explique pas uniquement par une absorption accrue de cholestérol ingéré mais aussi par une diminution de l'oxydation du cholestérol par le foie (17).

- Variations de l'excrétion globale des acides biliaires

On a recherché les modifications éventuelles de la quantité d'acides biliaires excrétés sous l'influence du régime alimentaire.

L'ingestion de grosses quantités de cholestérol, chez le rat fistulisé, accroît l'excrétion des acides biliaires par la bile (18) et, chez le chien intact, celle des produits acides fécaux dérivant des sels biliaires (19).

MAGGEE, KIM et IVY (20) ont noté une augmentation importante de l'acide cholique excrété après ingestion de certains acides aminés.

En raison de son importance physiologique probable, une place particulière doit être réservée à l'action des acides biliaires eux-mêmes sur leur néoformation. Il semble que les sels biliaires, qui augmentent puissamment le flux de la bile, puissent diminuer leur propre biosynthèse. BERGSTROM et ses collaborateurs (16) ont injecté dans le duodénum d'un rat porteur d'une fistule biliaire du taurochénodésoxycholate de sodium et dosé dans la bile s'écoulant du cholédoque le cholate excrété (On sait qu'il n'y a pas d'interconversion chez le rat des acides cholique et chénodésoxycholique). L'injection intraduodénale de 5 mg par heure de taurochénodésoxycholate de sodium fait tomber l'excrétion quotidienne de l'acide cholique de 40 à 60 mg à environ 4 mg. Ainsi le taurochénodésoxycholate, qui est absorbé et renvoyé au foie par la circulation porte, diminue-t-il l'excrétion de l'acide cholique. Or, l'accumulation intrahépatique d'un acide biliaire est très peu probable ; il semble donc que l'acide taurochénodésoxycholique, arrivant au foie, y déprime la biosynthèse de l'acide cholique.

Cette expérience montre la part prépondérante que doit jouer la réabsorption des acides biliaires au niveau de l'intestin grêle dans la régulation de la dégradation hépatique du cholestérol. Elle doit nous inciter à une grande prudence dans l'interprétation des résultats apportés par l'étude d'animaux fistulisés.

La nature et l'activité de la flore retentit peut être sur le métabolisme du cholestérol par son action au niveau des acides biliaires résorbés.

La quantité totale d'acides biliaires dans la circulation entérohépatique a pu être appréciée par des techniques de dilution isotopique (BERGSTROM et ERIKSON, 21). Chez un rat de 200g

on trouve de 9,2 à 12,4 mg d'acide cholique et une synthèse de 2 à 4mg/jour. La quantité d'acide chénodésoxycholique est 10 fois plus faible (13 à 18 mg de cholestérol précurseur doivent être dégradés pour la synthèse totale des acides biliaires).

La production totale d'acide cholique est de l'ordre de 15 à 20 mg/kg/jour. La demi-vie des acides biliaires chez le rat serait de deux à trois jours.

*

* *

*

LE CHOLESTEROL ET LES ACIDES BILIAIRES AU COURS DE LA VIE

EMBRYONNAIRE

Nous disposons de données relatives à l'apparition du cholestérol et à certaines phases de son métabolisme dans l'embryon d'oiseau et le fœtus de mammifère. A côté d'un transport massif de lipides du vitellus vers l'embryon, on a mis en évidence chez le Poulet la synthèse d'une quantité minime de stérols par le sac vitellin (22,23). Le cholestérol, libre au départ dans le vitellus de l'œuf fécondé, se retrouve en grande partie sous forme estérifiée dans l'embryon (24). Le foie accumule à partir du 18ème jour de la vie embryonnaire des quantités énormes de cholestérol estérifié (25,26,27,28,29), surtout sous forme d'oléate (30). Le foie gras au cholestérol atteint son maximum deux jours après l'éclosion et régresse dans les quinze jours qui suivent .

Dans le cas des Mammifères, la double origine du cholestérol fœtal par transport et par synthèse, a été également mise en évidence. Après les études de POPJAK menées chez le Lapin (31), GOLDWATER et STETTEN (32) ont retrouvé dans le fœtus une partie du deutérocholestérol ajouté au régime maternel. CHEVALLIER (33) amenant des Rattes gestantes à l'équilibre isotopique par l'administration prolongée de cholestérol 4^{14}C a précisé notamment le pourcentage de cholestérol que le fœtus reçoit de la mère. Une partie du cholestérol fœtal, en effet, est synthétisée in situ comme l'ont montré GOLDWATER et STETTEN (34) en administrant de l'eau lourde à la mère. Les résultats de CHEVALLIER suggèrent que le cholestérol "mobile" contenu dans le fœtus proviendrait dans une très grande proportion du placenta. On entend par cholestérol

"mobile" la fraction du cholestérol total de l'animal entier (50 à 60 p.100 chez l'adulte, 60 à 70 p.100 chez le fœtus de 13 jours) renouvelable par des transferts qui s'effectuent entre le sérum et les organes. L'ensemble de ces molécules constitue l'espace de transfert du cholestérol. Les origines du cholestérol contenu dans l'espace de transfert sont doubles : alimentaire et synthétique. Par ailleurs, WILLEE et HAGERMAN (35) ont montré que le foie fœtal de rat est capable de synthétiser le cholestérol *in vitro*. L'expérience est positive avec des coupes de foie au 15ème jour de la vie fœtale.

Après son apparition par transport ou synthèse, une partie du cholestérol fœtal s'échange entre plasma et tissu. CHEVALIER a déterminé la proportion de ce cholestérol "mobile" et montré l'origine synthétique du cholestérol fixe (33). Enfin contrairement à l'Oiseau, le foie embryonnaire des Mammifères n'accumule pas de cholestérol. Le placenta fœtal, cependant, dans le cas de la lapine est très riche en cholestérol; l'importance de la concentration du cholestérol estérifié dans cet organe, a suggéré à CAHN et HOUGET (36) que l'estérification s'effectue sur place. Ainsi s'est ébauchée une analogie métabolique qu'une comparaison anatomique aurait pu laisser prévoir entre le fœtus de Mammifère et son placenta d'une part, l'embryon d'Oiseau et son sac vitellin de l'autre.

Le catabolisme du cholestérol, au cours de la vie embryonnaire, n'a été que très peu étudié jusqu'ici. Si quelques travaux histologiques ont cherché à fournir des précisions quant à la date de la sécrétion biliaire (37,38,39), les faits concernant les acides biliaires au cours de la vie prénatale sont peu nombreux. WHITEHOUSE et coll.(40) ont vu que le foie des embryons de poulet et de rat est capable de dégrader *in vitro* la chaîne terminale du cholestérol 26^{14}C entre le 12ème et le 14ème jour d'incubation chez le poulet et dès le 13ème jour de gestation chez le

rat. Mais les produits d'oxydation n'ont pas été isolés. Or d'autres auteurs ont noté, in vitro chez le rat, l'oxydation non enzymatique du cholestérol en substances plus polaires (41). On s'expose donc à des artefacts avec ce type d'expérience. DANIELSSON signale incidemment avoir obtenu la conjugaison des acides biliaires, libres à partir du 17ème jour chez l'embryon de Rat; cette réaction atteint une grande efficacité à la naissance.

DANIELSSON et RUTTER (42) enfin, étudiant chez le rat le métabolisme des acides cholique, désoxycholique et de quelques précurseurs avec des homogénats de foie d'embryons et de nouveau-nés, constatent que l'activité spécifique des enzymes assurant la conjugaison des acides biliaires est multipliée par 30 à 40 entre le 15ème jour après la fécondation et le 5ème jour après la naissance. Ils observent une augmentation d'activité analogue pour les enzymes catalysant l'oxydation du 5 β cholestane 3 α ,7 α ,12 α triol et l'hydroxylation en 12 α du 7 α hydroxycholest 4-en-3-one. Ces résultats suggèrent que l'activité des enzymes impliqués dans la conversion du cholestérol en acides biliaires augmente de façon synchrone dans le foie du rat au cours du développement.

Une étude plus approfondie des acides biliaires chez l'embryon méritait pourtant d'être entreprise.

L'étude biochimique du volet terminal du catabolisme du cholestérol au cours de la vie embryonnaire ne pouvait manquer de fournir des données intéressantes : date d'apparition de la dégradation du cholestérol en acides biliaires, nature des acides biliaires, de leur conjugaison, conversions diverses dans un organisme "germ-free" et, dans le cas de l'Oiseau, isolé de la mère, et évolution quantitative au cours de l'embryogenèse.

Le rôle physiologique des acides biliaires est bien connu chez l'adulte. Au niveau intestinal, ils participent à la résorption des lipides et d'une façon plus générale conditionnent le fonctionnement normal de la muqueuse ; au niveau du foie ils règlent la transformation oxydative du cholestérol.

Ils jouent un rôle essentiel dans l'émulsification des lipides alimentaires au cours de leur digestion par la lipase pancréatique et ils exercent, au pH du milieu (6,5) , un effet activateur sur cette enzyme. On sait que les acides gras libres, en formant des savons, améliorent le pouvoir émulsifiant du système et que les monoglycérides produits par l'action de la lipase présentent des propriétés détergentes distinctes. Finalement les acides gras, les monoglycérides, les lysolécithines et les sels biliaires concourent à la solubilisation des graisses, notamment du cholestérol, et permettent leur absorption intestinale sous forme de micelles (43). Après l'absorption des graisses, les sels biliaires libérés des micelles sont absorbés surtout à l'extrémité distale de l'iléon.

Leur action n'est pas moins essentielle au niveau de la muqueuse intestinale. Ils favorisent la resynthèse des triglycérides à partir des acides gras et des mono ou diglycérides (47). Cette estérification des acides gras est confirmée par des expériences portant sur l'étude du contenu intestinal de chiens normaux ou privés de bile après ingestion de repas dont la teneur en lipides est connue (45) et par des expériences effectuées in vitro avec de l'intestin de rat. Ils stimulent en outre l'absorption du Calcium.

Dans le foie, ils règlent la dégradation et la synthèse du cholestérol par l'intermédiaire de leur concentration portale.

Ces faits laissent pressentir l'importance de la sécrétion des acides biliaires sur l'évolution physiologique du système digestif au cours de la vie foetale.

Enfin sur le plan de la différenciation cellulaire, l'oxydation du cholestérol en acides biliaires, la conjugaison de ces derniers et les réactions qui chez certaines espèces transforment un acide biliaire en un autre, constituent autant de tests spécifiques de la maturation de l'hépatocyte au cours de la différenciation fonctionnelle du foie. Le mode de conjugaison étant différent suivant les espèces, les réactions de conjugaison des acides biliaires libres pourraient être utilisées in vitro comme marqueurs génétiques au cours d'éventuelles expériences d'hybridation cellulaire portant sur des clones différenciés ou non.

*

* *

*

Nous avons commencé dans la première partie de ce travail par étudier la formation et la conjugaison des acides biliaires in vivo. Cette étude chez l'embryon était nécessaire pour préciser le catabolisme du cholestérol au cours du développement embryonnaire et reconnaître éventuellement le rôle physiologique des acides biliaires avant la naissance.

Ce travail in vivo était un préambule indispensable à l'utilisation de la synthèse et de la conjugaison des acides biliaires comme test de la différenciation de l'hépatocyte in vitro. En effet, toute étude in vitro de la différenciation requiert un système cellulaire qui, selon les conditions expérimentales, exprime ou n'exprime pas le test de différenciation choisi.

Si la formation et la conjugaison des acides biliaires se manifestait brutalement à une date tardive nous pouvions espérer utiliser pour nos cultures du foie prélevé avant cette date et l'amener *in vitro* à exprimer ce test de maturation. D'autre part toutes variations d'activités enzymatiques, *in vivo*, laisseraient supposer que des modulations comparables pouvaient être produites *in vitro*.

C'est pourquoi nous nous sommes attachés à préciser la date d'apparition et l'évolution quantitative des acides biliaires au cours de la vie embryonnaire chez le fœtus de quelques mammifères et chez l'embryon de poulet. Nous avons déterminé chez ce dernier *in ovo* la date d'apparition de la conjugaison des acides biliaires à la taurine.

*

* x

*

- P R E M I E R E P A R T I E -
=====

I - LES ACIDES BILIAIRES AU COURS DE LA VIE EMBRYONNAIRE ET NEONATALE . ETUDE IN VIVO

1)- MATERIEL ET TECHNIQUES

MATERIEL ANIMAL-

Nous avons utilisé des rattes Wistar WAG et CF dont la date d'accouplement a été déterminée par la présence de spermatozoïdes dans le frottis vaginal. Nous avons considéré cette date comme le 1er jour de la gestation. Les lapines provenaient d'un élevage de "GEANTS DE BOUSCAT"; les truies "LARGE WHITE", ont été fournies par le C.N.R.Z. de Jouy-en-Josas. Pour ces deux animaux nous avons pris la date du coït comme début de la gestation. Les cobayes albinos, d'une souche homogène étaient livrées pleines au laboratoire et mettaient bas en présence d'un mâle, mais l'ovulation post-partum n'a permis de dater les foetus qu'avec une certaine imprécision (de l'ordre de 5 jours). Les oeufs de poule "COUCOU MARANS" pour les dosages et LEGHORN pour l'étude de la conjugaison des acides biliaires à la taurine, ont été incubés à 38°C.

En vue du dosage du cholestérol et des acides biliaires, les foetus de mammifères ont été prélevés in utero, ou les petits sacrifiés à des temps divers après la naissance. Les foies des animaux d'une même portée ont été groupés pour analyse. Il en fut de même pour les estomacs, intestins, leur contenu et éventuellement les vésicules biliaires (absentes, rappelons-le, chez le Rat). On procède de façon analogue avec les groupes d'embryons de poulet de même âge.

La date d'apparition de la conjugaison des acides biliaires in ovo a été déterminée sur des lots d'embryons de poulet sacrifiés à un stade donné après administration de cholate ^{14}C . La recherche des tauroconjugués a porté sur les embryons récoltés avec leur liquide amniotique et allantoïdien.

ACIDES BILIAIRES -

Nous avons utilisé les échantillons standards suivants :

- Acides cholique et désoxycholique - Nous avons préparé ces acides par recristallisation dans l'alcool à 70° de produits du commerce. Leur point de fusion au bloc Maquenne était de 200°C pour l'acide cholique et de 185-186°C pour l'acide désoxycholique.

- Acide chénodésoxycholique -

Echantillon standard - Nous sommes partis de bile de poulet qui renferme cet acide presque uniquement sous forme tauroconjuguée. Le procédé utilisé fut celui de WINDAUS et coll.(46) précédé d'une étape purificatrice supplémentaire, à savoir un passage sur colonne échangeuse d'anions. Ainsi, l'acide taurochénodésoxycholique est retenu par la résine alors que les pigments sont presque entièrement élués. Nous avons préparé l'acide taurochénodésoxycholique brut à partir duquel on obtient l'acide chénodésoxycholique pur.

On recueille dans l'alcool une centaine de vésicules de poulet fraîches. Après extraction par l'alcool bouillant, on amène à siccité et on déshydrate par l'alcool absolu. Le résidu de dessiccation est délipidé par le benzène anhydre au bain-marie à reflux, puis remis en solution dans l'alcool à 95° bouillant; la solution trouble est filtrée à chaud. Une prise de 40 ml est addi-

tionnée d'un volume égal d'eau. Le tout est passé en 1 heure à travers une colonne d'Amberlite IRA 400 (CH_3COO^-) de 23 sur 250mm préalablement rincée à l'eau alcoolisée (1 vol/1 vol). Après 3 lavages à l'eau, les pigments sont élués par 350 ml d'une solution N d'acide formique dans l'eau alcoolisée volume pour volume. Après rinçage (50 ml d'eau alcoolisée 50/50), on élue les tauroconjugués et le reste des pigments par le mélange suivant : NaCl 23 g, alcool 100 ml, eau 100 ml. L'éluat amené à sec est déshydraté par l'alcool absolu. Le résidu est repris à chaud par l'alcool absolu et la solution filtrée sur Büchner. Le filtrat amené à siccité est pesé (5,55g) , puis dissous dans l'alcool à 95° (70ml). La solution est versée goutte à goutte dans un mélange de 600 ml d'acétate d'éthyle et 100 ml d'éther de pétrole léger. On obtient un précipité pulvérulent qu'on centrifuge, lave et reprend par l'alcool à 95°. La solution, traitée à l'ébullition par du charbon végétal, est ensuite filtrée à chaud. Le filtrat est versé goutte à goutte dans 600 ml d'acétate d'éthyle. Le précipité est recueilli et lavé : on obtient ainsi 4 g de taurochénodésoxycholate de Na brut. Une prise de 2 g de ce sel est chauffée pendant 15 heures au bain-marie bouillant en présence de 22 g de potasse et 160 ml d'eau. L'hydrolysate est acidifié par HCl dilué. On obtient un précipité blanc amorphe qu'on recueille par filtration et lave à l'eau, puis à l'éther de pétrole. On le dissout dans l'alcool à 95° et la solution est amenée à siccité ; on obtient ainsi 1,45g d'acide chénodésoxycholique brut. Cet échantillon, repris par l'alcool absolu, est filtré. Après dessiccation du filtrat, on retrouve 1,2 g de précipité. Celui-ci est mis à bouillir à reflux pendant 2 heures avec 3 ml d'alcool à 96° et 5 ml d'éthylate de Na (correspondant à 250 mg de Na). Le chénodésoxycholate de Na jaunâtre cristallise (0,9g). Ce sel est mis en solution dans 3,5 ml d'alcool à 65 p.100 ; on y ajoute goutte à goutte 2 ml d'eau distillée contenant 300 mg de BaCl_2 . Le sel de Ba, également jaunâtre, précipite. On le lave à l'eau, puis on le met en solution dans l'alcool acidi-

fié par un peu d'HCl, ce qui libère l'acide. On convertit celui-ci en sel de K, puis on acidifie par addition goutte à goutte d'HCl concentré. Le précipité blanc est centrifugé, lavé à l'eau, puis dissous dans un mélange d'éther éthylique (3 vol.) et de benzène (1 vol.). Après 3 lavages à l'eau distillée, la solution éthérobenzénique est amenée à sec. Le résidu desséché par l'alcool et le benzène est pesé (0,6g). On le remet en solution dans l'acétate d'éthyle à chaud. La solution est versée goutte à goutte dans l'éther de pétrole. Le liquide est mis à la glacière. Il se développe alors une cristallisation sous forme de masses blanchâtres et gélatineuses que l'on décante et qu'on lave par un mélange d'acétate d'éthyle et d'éther de pétrole. Une seconde cristallisation est répétée dans les mêmes conditions et fournit de nouveaux amas gélatineux que l'on met en solution dans un excès d'acétate d'éthyle; la solution, filtrée, est amenée à siccité. Le résidu se présente sous forme de plaquettes légèrement jaunes. On effectue une troisième cristallisation. A la glacière, il se dépose sur les parois du flacon des amas opalescents que l'on recueille, que l'on sèche et que l'on pèse. Nous avons ainsi obtenu 0,21 g d'acide chénodésoxycholique ayant un point de fusion de 138°5 -140°5 au bloc Maquenne.

TECHNIQUES D'EXTRACTION DU CHOLESTÉROL ET DES ACIDES BILIAIRES

Les organes sont broyés, leurs protéines précipitées par l'alcool bouillant et après un repos de 12 heures, extraites à chaud par l'alcool à 95°. Dans le cas des oeufs ayant reçu du cholate C¹⁴, nous avons pris la précaution d'ajouter avant la précipitation, 400 µg de taurocholate entraîneur par embryon.

Cholestérol - Ces extraits alcooliques de foie, évaporés à sec, sont repris par le benzène. Les graisses totales d'une prise aliquote sont saponifiées (KOH alcoolique N, 2 h au bain-marie bouillant) et la liqueur de saponification, diluée de moitié avec de

l'eau, est amenée à alcalinité 0,1N. Les substances insaponifiables sont extraites en trois fois par l'éther de pétrole.

Acides biliaires - Pour détecter la présence éventuelle de taurocholate après administration de cholate marqué à des oeufs embryonnés, une prise aliquote de l'extrait alcoolique est directement chromatographiée sur couche mince de gel de silice. Dans tous les autres cas, une purification préalable des extraits a été jugée nécessaire. Les extraits alcooliques de la vésicule biliaire et du tractus digestif sont amenés à sec et repris par l'éthanol à 60 p.100. La suspension est acidifiée par un peu d'acide acétique et délipidée à contre-courant par l'éther de pétrole. Les extraits hydro-alcooliques purifiés, neutralisés par la potasse, sont évaporés à sec, repris par l'alcool absolu et la solution amenée à volume connu. Elle servira à la détermination qualitative des acides biliaires conjugués après chromatographie sur plaque.

Les acides biliaires conjugués sont hydrolysés (KOH aqueux 2N; 6 h au bain-marie bouillant). Après refroidissement, l'hydrolysats est additionné d'alcool jusqu'à concentration à 60 p.100, acidifié par HCl et extrait trois fois à contre-courant par l'éther de pétrole. La liqueur hydrolysée est neutralisée et l'alcool chassé par évaporation. L'hydrolysats est acidifié par HCl et les acides biliaires libres extraits par l'éther éthylique fraîchement distillé. Les extraits étherés sont immédiatement évaporés sous pression réduite. Toute trace d'éther est éliminée; les acides biliaires libres sont repris par l'acétone et la solution amenée à volume connu.

Les méthodes d'hydrolyse et de purification ont été vérifiées sur un échantillon de 125 µg d'acide taurocholique: la récupération a été quantitative.

TECHNIQUES DE DETECTION ET DE DOSAGE -

Détection -

La détection des acides biliaires (à l'exception de l'acide taurocholique) chez le foetus de rat se fait par chromatographie unidimensionnelle et ascendante sur couche mince de gel de silice (Silicagel g Merck), en utilisant successivement deux systèmes de solvants :

- 1)- éther éthylique / acide acétique 99/1
- 2)- un des mélanges suivants (ENEROTH, 47) :

pour les acides biliaires conjugués :

- alcool amylique	40
- alcool acétique	30
- n-propanol	20
- eau distillée	10

pour les acides biliaires libres :

- isooctane	25
- acide acétique	1
- acétate d'éthyle	125

En vue de la recherche d'acide taurocholique chez le foetus de rat, trois systèmes de solvants sont utilisés successivement, en chromatographie ascendante les deux premiers dans un sens, le troisième perpendiculairement sur couche mince de gel de silice :

- 1)- éther éthylique / acide acétique 99/1,
- 2)- la phase supérieure du mélange toluène/acide acétique/eau/10/10/1,
- 3)- toluène/alcool méthylique/acide acétique 60/60/3.

La révélation est faite à chaud avec le réactif de KRITCHEVSKY (48) (observation en lumière blanche) et par SO_4H_2 dilué (observation en lumière blanche et U.V.). Dans le cadre de ce travail, on peut considérer que la nature des acides biliaires est déterminée lorsque l'échantillon se comporte identiquement au standard sur les chromatogrammes effectués avant et après hydrolyse: Rf, coloration et fluorescence avec les deux réactifs.

La présence de substances radioactives sur les chromatogrammes est révélée par autoradiographie (film Kodirex, 15 jours de pose).

Dosage du cholestérol et des acides biliaires -

Le cholestérol total hépatique du lapin et du poulet est déterminé par pesée du précipité digitonique. Nous avons dosé l'acide cholique chez le Rat, le Lapin et le Poulet, l'acide désoxycholique chez le Lapin et l'acide chénodésoxycholique chez le Poulet.

Nous avons utilisé, après une mise au point, la méthode décrite par FROSCH et WAGENER (49) sauf dans le cas du rat où nous avons adopté, après modification la méthode de GREGORY et PASCOE (50).

1)- Dosage du cholestérol -

Nous avons déterminé le cholestérol dans l'insaponifiable par pesée du précipité digitonique selon la technique de THIVOLLE (51), modifiée par CAHN et HOUGET.

Mode opératoire - La prise de l'insaponifiable total, contenant entre 4 et 8 mg de stérols précipitables, est amenée à sec avec précaution en évitant de chauffer le résidu. On dissout les sub-

stances insaponifiables dans 7 ml du mélange suivant :

- 465 ml d'éthanol à 95°,
- 35 ml de chloroforme.

On ajoute 10 ml de la solution suivante :

- digitonine 0,4 g
- acétate d'ammonium 0,05 g
- alcool à 95° 80 ml
- chloroforme 20 ml

puis 5 ml du mélange :

- acétone 370 ml
- eau 130 ml

On amorce la précipitation avec un agitateur fin et on laisse reposer pendant 1 heure. On filtre ensuite sur un creuset de Büchner taré (n° 172114 Pyrex) en prenant la précaution de ne faire qu'un vide léger au cours de la filtration. Rincer le béc-cher et le filtre avec 2 + 1 + 1 + 1 ml du mélange de solvants sui-
vant :

- acétone 3 ml
- alcool 95° 77 ml
- chloroforme 20 ml

Sécher à 110° le creuset pendant 45 minutes. Le coefficient expé-
rimental :

$$K = \frac{\text{cholestérol}}{\text{digitonide}}$$
, voisin de 0,250 est précisé à
l'aide de cholestérol standard pour chaque série de dosage.

2)- Dosage des acides biliaires -

A)- Dosage des acides biliaires après séparation chromatographique

Nous avons cherché à adapter une méthode décrite pour le dosage des hormones stéroïdiques. Après pulvérisation d'a-
cide sulfurique et chauffage on photographie en U.V. le chromato-
gramme. L'intensité de la fluorescence enregistrée par le film est

mesurée à l'aide d'un densitomètre optique. Quelques essais préliminaires avec l'acide chenodésoxycholique nous ont amené à abandonner cette méthode qui a paru manquer de fidélité.

Nous avons fait alors l'essai du dosage spectrophotométrique des acides biliaires, après séparation chromatographique sur gel de silice, tel qu'il est décrit par FROSCH et WAGENER(49).

a)- Description de la méthode originelle -

Les Acides Biliaires, séparés par chromatographie en couche mince de gel de silice, sont révélés par pulvérisation d'eau bidistillée. Les plages correspondant aux taches ainsi repérées sont prélevées et traitées dans des tubes à centrifugation pendant une heure à 60°C par 4 cc d'acide sulfurique à 65p.100. Après centrifugation, le surnageant limpide est examiné au spectrophotomètre, à la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption. Une plage de poudre vierge, de même Rf que les échantillons à doser et traitée de la même manière, sert de référence pour les lectures.

Cette méthode rappelle beaucoup celle qu'avait décrite SJÖVALL (52) pour le dosage des Acides Biliaires libres et conjugués après séparation chromatographique sur papier et élution. En absence de précisions fournies par FROSCH et WAGENER quant à la concentration en acide sulfurique, nous avons utilisé d'abord une concentration de 65 p.100 exprimée en volume, telle que l'avait définie les auteurs suédois.

b)- Etude de la réaction -

La mise au point de cette méthode nécessitait l'étude préalable des facteurs intervenant dans la réaction de l'acide sulfurique avec les acides biliaires. L'adsorption des

acides biliaires au cours de leur migration chromatographique ne peut que diminuer l'intensité de la réaction ; nous évaluerons l'importance de ce phénomène dans le paragraphe consacré à la sensibilité de la méthode. Nous aborderons successivement ici l'influence éventuelle du silicagel sur la nature, l'intensité (et l'évolution) de la réaction ; nous préciserons les meilleures conditions d'emploi de l'acide sulfurique (volume et concentration), la durée optimale du chauffage et la température ; nous rechercherons enfin le mode de révélation approprié.

Nous avons utilisé l'acide cholique et le silicagel G de Merck.

INFLUENCE DU SILICAGEL SUR LA REACTION DE L'ACIDE SULFURIQUE AVEC L'ACIDE CHOLIQUE

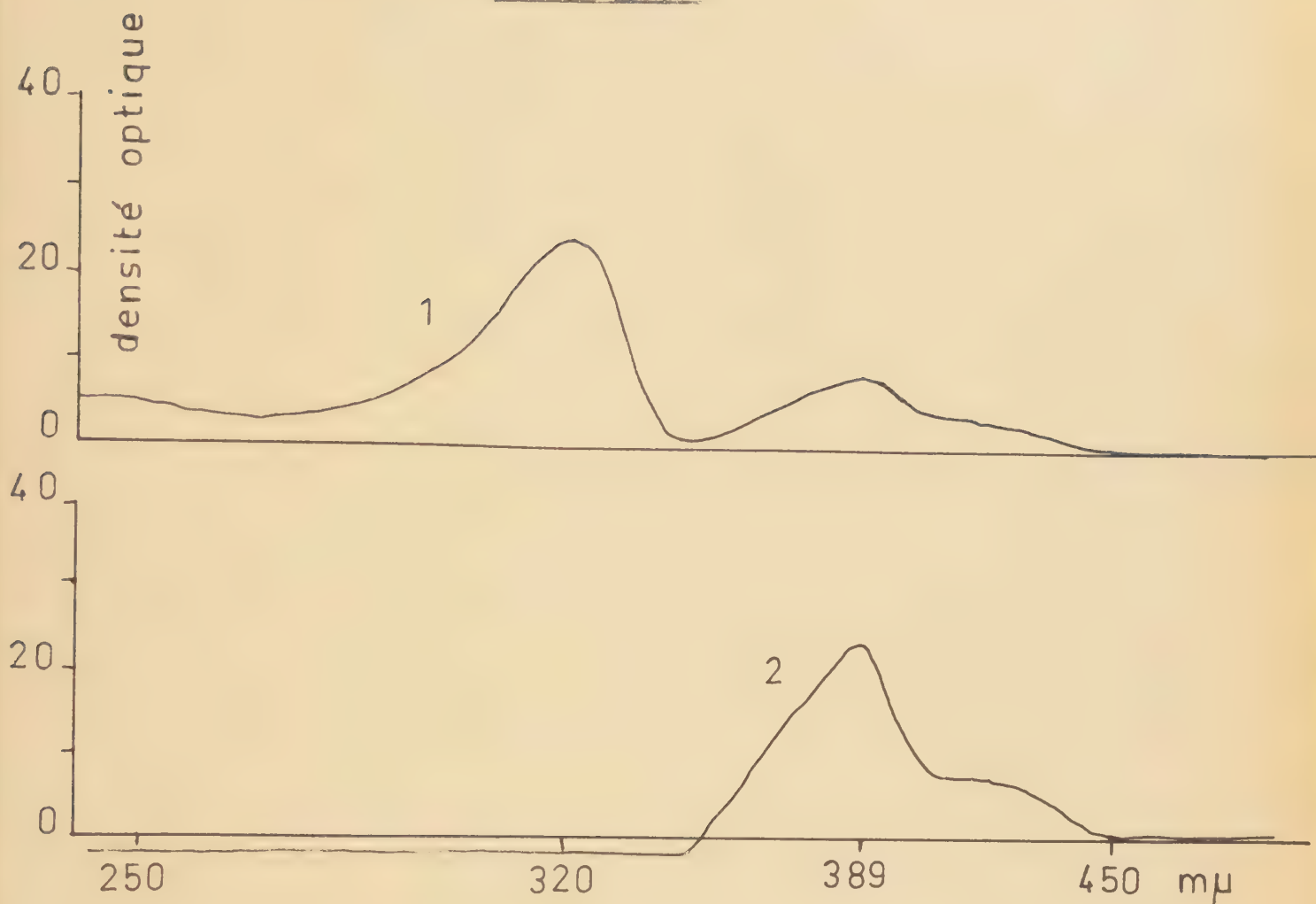
Pour tous ces essais, nous avons suivi le mode opératoire préconisé par FROSCH et WAGENER. Nous avons donc comparé la réaction donnée par l'acide cholique pur à celle produite par l'acide cholique prélevé avec sa plage de silicagel après chromatographie. Le développement du chromatogramme est effectué par les deux systèmes de solvants indiqués plus haut.

L'étude des spectres d'absorption, après examen des liquides surnageants au spectrophotomètre Beckmann, montre (FIG.n°3)

- FIGURE n° 3 -

- un seul maximum à 389 m μ dans le cas de l'acide cholique en présence de son support de silicagel après chromatographie,
- deux maxima à 320 m μ et à 389, m μ dans le cas de l'acide cholique pur.

- FIGURE n°1 -



Spectres d'absorption développés par l'acide cholique après chauffage à 60° C en présence d'acide sulfurique à 65 p.100 pendant 60 minutes.

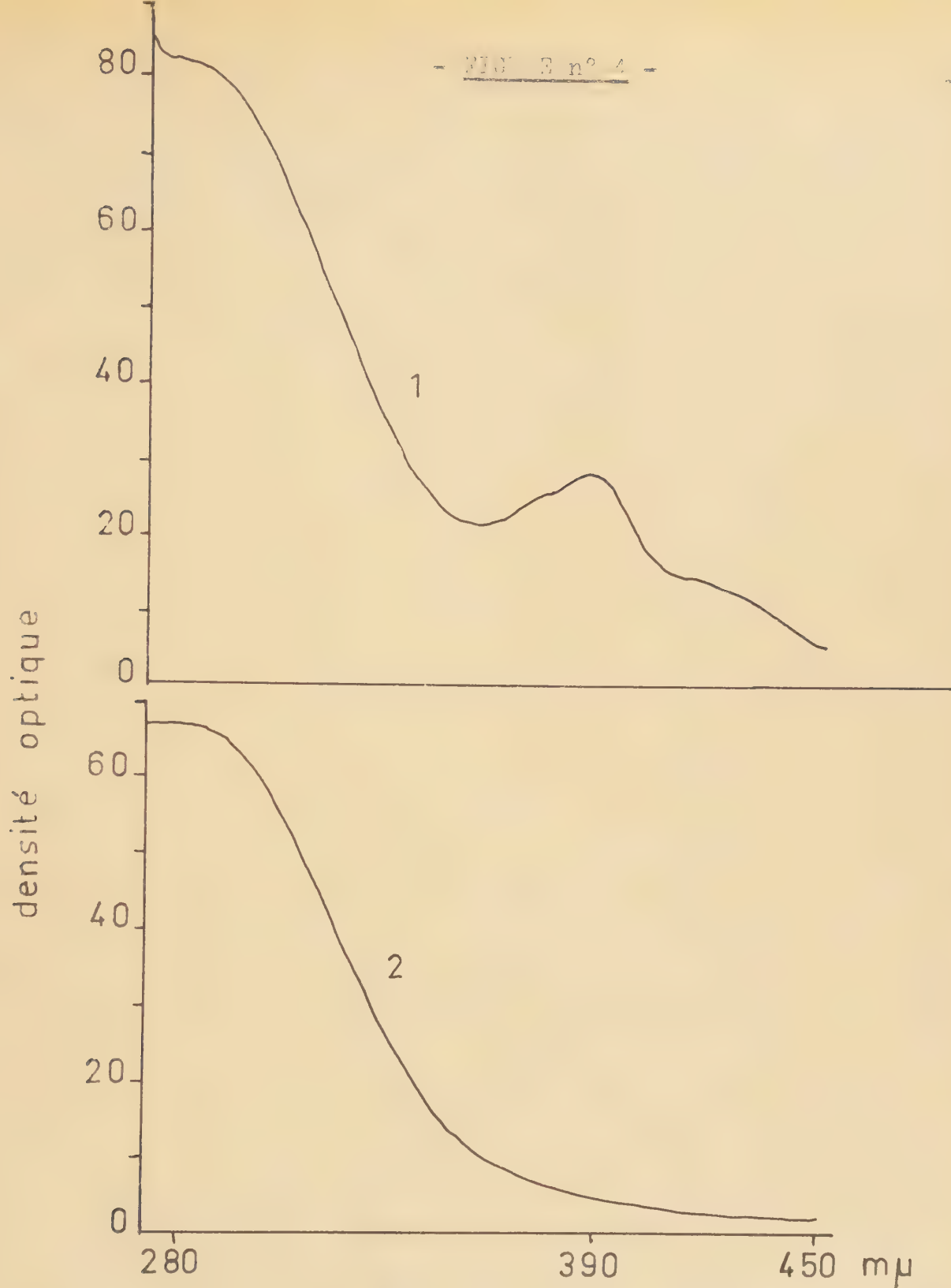
En haut : acide cholique pur. En bas , acide cholique en présence de silicagel, après chromatographie sur couche mince.

- PURIFICATION DU SILICAGEL -

Ce comportement différent de l'acide cholique pur et de l'acide cholique sur support de silicagel nous a conduit à étudier l'influence des impuretés du silicagel sur la réaction. SJOVALL(52) avait montré l'influence des impuretés métalliques, du fer en particulier, sur le spectre d'absorption de l'acide cholique chauffé en présence d'acide sulfurique à 65p.100 : l'intensité de l'absorption à 320 mμ décroissait à mesure que se précipitait un maximum vers 385 mμ. Nous avons alors songé à débarrasser la couche de silicagel de ses impuretés métalliques avant la chromatographie et avons examiné l'influence, sur le spectre développé par l'acide cholique, d'un traitement préalable des plaques par 10 p.100 d'acide chlorhydrique concentré dans le méthanol. L'examen des spectres enregistrés en prenant comme référence l'acide sulfurique à 65 p.100 en volume, révèle une influence systématique de la purification du silicagel sur la réaction de l'acide cholique avec l'acide sulfurique.

En présence de silicagel non "traité" l'acide cholique présente un maximum d'absorption à 389 mμ (FIG. n° 4) et, à partir de 350 mμ, vers l'U.V., une zone d'absorption intense sans maximum. Cette zone de forte absorption se retrouve dans le spectre fourni par le silicagel non "traité" chauffé avec de l'acide sulfurique à 65 p.100 en absence d'acide cholique ; elle correspond donc au produit de la réaction de l'acide sulfurique avec le silicagel impur en l'absence d'acide cholique.

En présence de silicagel "traité" l'acide cholique montre un maximum d'absorption à 389 mμ et un plateau vers les courtes longueurs d'onde à partir de 320 mμ. Si l'on rapporte le spectre



Spectres d'absorption développés en présence de silicagel non traité. En haut : 50 μg d'acide cholique après chromatographie sur silicagel non traité. En bas : spectre développé par le silicagel non traité en l'absence d'acide cholique. Les spectres sont enregistrés en présence de l'acide sulfurique à 65 p.100 comme référence.

de cette seconde réaction non plus à l'acide sulfurique à 65p.100 mais au liquide de référence correspondant (silicagel purifié + SO_4H_2 à 65 p.100) on voit apparaître un second maximum d'absorption à 320 m μ . Le silicagel purifié, chauffé avec l'acide sulfurique, fournit une absorption beaucoup moins intense aux courtes longueurs d'onde que le silicagel non purifié (FIG.n° 5).

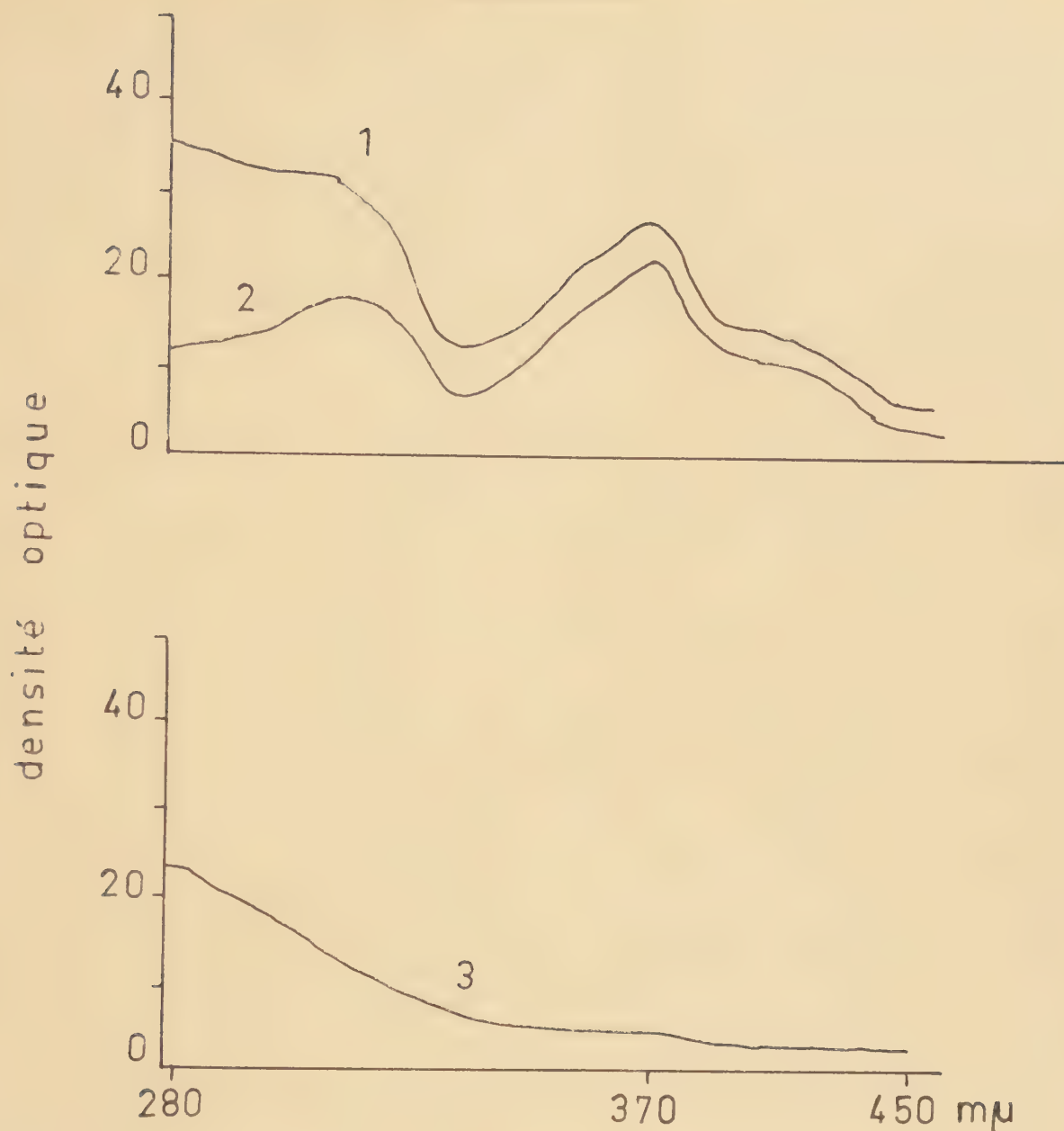
- FIGURE n° 5 -

La purification du silicagel dont l'intérêt est mis en évidence par cet essai, nous a toutefois semblé insuffisante pour effectuer nos mesures à 320 m μ avec assez de sensibilité. L'absorption développée par l'acide cholique à 320m μ en présence de silicagel purifié est faible par rapport à celle qu'il développe en l'absence de tout silicagel. En second lieu l'existence d'une importante absorption résiduelle due au silicagel à cette même longueur d'onde compromettrait la fidélité de la méthode : la moindre différence de prélèvement du silicagel sur une même plaque se répercuterait sur le dosage en faisant varier l'absorption de fond par rapport à une même référence. Dès lors nous avons effectué les lectures à 389 m μ sans purification du silicagel. A cette longueur d'onde, en effet, l'absorption développée par la réaction est plus importante et celle du liquide de référence minime.

- ACIDE SULFURIQUE -

Nous référant au mode opératoire décrit par SJOVALL pour le dosage des Acides Biliaires après séparation chromatographique sur papier et élution nous avons utilisé d'abord une concentration de 65 p.100 exprimée en volume. Or, il arrivait dans quelques cas que toutes les plages correspondant à une même plaque fussent impropres aux dosages, les densités optiques développées étant pratiquement nulles. Nous nous interrogeons sur la cause de ce phénomène lorsque nous primes connaissance d'un article de GANSHIRT

- FIGURE n° 5 -



Spectres d'absorption développés en présence de silicagel purifié.

En haut - 50 μg d'acide cholique après chromatographie sur silicagel purifié : courbe n° 1, enregistrement avec SO₄ H₂ à 65 p.100 comme référence; la courbe n° 2 est obtenue en soustrayant de la courbe n° 1 les ordonnées de la courbe n° 3.

En bas : spectre développé (courbe n° 3) par le silicagel purifié en l'absence d'acide cholique (mêmes conditions que dans Figure n° 4)

KOSS et MORIANZ (53) qui décrivent un dosage analogue d'Acides Biliaires où la concentration d'acide sulfurique est fixée en poids et non en volume. Nous avons dès lors utilisé de l'acide sulfurique à 65 p.100 en poids et la méthode ainsi modifiée nous donna satisfaction en tous points tant pour les quelques dosages d'acide cholique qu'il nous restait à faire que pour la totalité des dosages des acides désoxycholique et chénodesoxycholique.

- CONDITIONS DE CHAUFFAGE -

Nos essais ont consacré, par ailleurs, les conditions de chauffage préconisées par FROSCH et WAGNER : 60 minutes à 60°.

- REVELATION DES CHROMATOGRAMMES -

Une aspersion trop importante d'eau bidistillée provoque la diffusion accidentelle de l'acide cholique dans le silicagel au-delà de la plage prélevée ; nous avons donc rapidement abandonné la localisation des acides biliaires par pulvérisation d'eau. En effet le Rf de l'acide cholique étant pratiquement le même pour toutes les prises d'une même plaque, il nous a paru plus commode de localiser la zone à découper en repérant par l'acide sulfurique et chauffage une tache témoin à chacune de ses extrémités. La pulvérisation d'acide sulfurique est localisée à la zone utile à l'aide d'un cache.

Les modifications apportées à la méthode n'ont pas déplacé le maximum d'absorption dans le cas de l'acide cholique qui est resté fixé à 389 mμ. Quant au maxima correspondant aux réactions des acides chénodésoxycholique et désoxycholique ils furent respectivement de 386 mμ et de 383 mμ.

c)- Méthode utilisée après mise au point -

Réactifs utilisés :

- silicagel G Merk
- acide sulfurique à 65p.100 en poids.

Mode opératoire :

Sur une couche de 20ccx20cc et de 1/4 mm d'épaisseur de silicagel G préparé avec de l'eau bidistillée, nous déposons 6 prises à l'aide d'une seringue Hamilton : 4 prises d'acide biliaire standard de quantité croissante et 2 prises de l'échantillon à doser dont l'une est de volume double de l'autre. Une prise d'acide biliaire "témoin" est en outre déposée à chaque extrémité de la ligne de départ et permettra de localiser la zone à découper.

Après passages successifs dans les deux bains de solvants indiqués et séchage, les témoins sont repérés par pulvérisation d'acide sulfurique aux extrémités de la plaque à l'aide d'un cache et chauffage. Les plages correspondantes, prélevées avec une lamelle de verre, sont introduites dans les tubes à centrifuger. Un septième tube reçoit une plage de silicagel de référence, de Rf voisin.

Après addition de 2,5cc d'acide sulfurique à 65p.100 et homogénéisation à l'agitateur, les tubes sont chauffés une heure à 60°, refroidis, puis centrifugés pendant 10 minutes à 1500 g. Le surnageant est prélevé et son absorption à la longueur d'onde convenable est déterminée au spectrophotomètre Beckmann.

d)- Justification de la méthode -

- précision et sensibilité de la méthode . La réaction obéit à la loi de BEER-LAMBERT comme le montre les FIGURES 6 et 7. La sensibilité de la méthode est de l'ordre de 4 p.100 (TABLEAU n° 1).

- FIGURES n° 6 et n° 7 -- TABLEAU n° I -Précision du dosage

Quantité présente d'acide cholique en µg	Quantité trouvée d'acide cholique en µg
23,40	23,20
23,40	25,01
23,40	22,83
23,40	20,6
23,40	24,60
23,40	25,0
23,40	23,50
23,40	22,40
23,40	23,0
23,40	22,80

P) - Dosage spectrophotométrique de l'acide cholique chez le fœtus de rat.

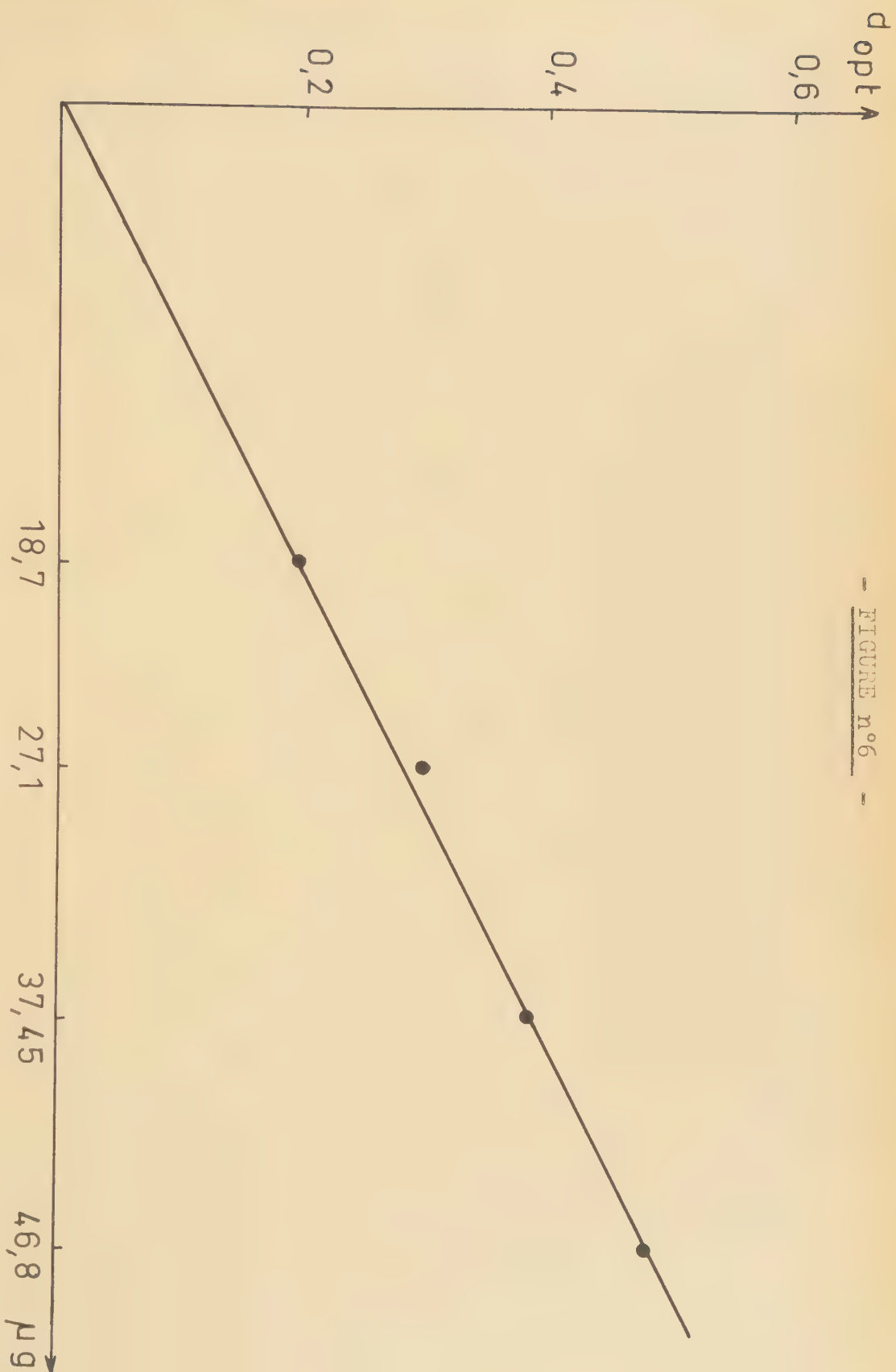
Nous avons mis au point le dosage de l'acide cholique d'après PETTENKOFER. En modifiant la réaction de cet auteur. GREGORY et PASCOE (50) devaient apporter à la réaction furfural-sulfurique, une spécificité qui autorisait son application quantitative. On a proposé depuis de nombreuses modifications (54,55) que nous avons utilisées en le combinant afin d'augmenter la sensibilité et la précision de la méthode originelle.

- Mode opératoire -

Réactifs : Solution aqueuse de furfural à 0,9p.100 (en volume),
Acide acétique glacial pour analyse,
SO₄H₂ pour analyse 16N,
Ethanol à 97° , redistillé.

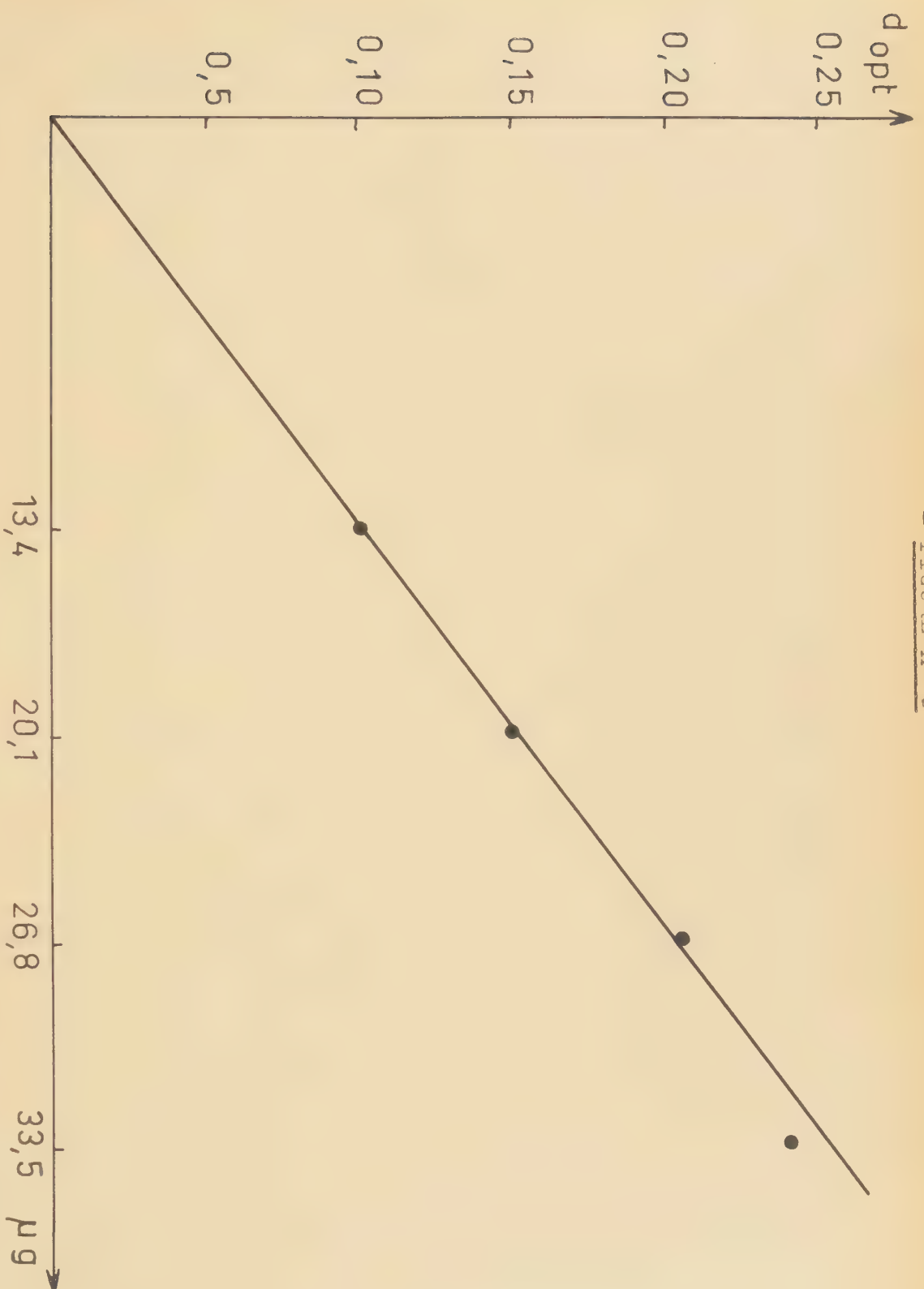
N.B. - Le furfural commercial est redistillé et conservé sous vide. La solution aqueuse à 0,9p.100 se conserve pendant trois mois, à la glacière, sans diminution de l'intensité de la réaction. A préserver de la lumière.

- FIGURE n°6 -



Densité optique développée à 389 nm en fonction des quantités
d'acide chlorique

- FIGURE n° 8 -



Densité optique à 386 m μ en fonction des quantités
d'acide chénodésoxycholique

La prise d'essai, contenant de l'acide cholique libre en solution alcoolique, est introduite dans un tube. L'alcool est évaporé à sec au-dessous de 70°.

Dissoudre le culot de dessiccation dans 2,5cm³ d'acide acétique glacial.

Ajouter 1cm³ de solution de furfural; mélanger puis introduire 6cm³ de SO₄H₂ 16 N. Agiter. Mettre au bain-marie à 65° pendant 30'. Refroidir dans l'eau.

Ajouter, en agitant soigneusement, 3cm³ d'éthanol. Lire l'absorption sans trop tarder à 6.750 Å, en retranchant l'absorption propre aux réactifs.

Faire en même temps, la même réaction sur une série de standards préparés à partir d'une solution alcoolique d'acide cholique et sur un blanc ne contenant que les réactifs utilisés.

Remarques : La coloration propre aux réactifs est négligeable et l'évolution lente.

L'usage de l'acide acétique glacial, joint à la prolongation du chauffage, augmente beaucoup la sensibilité de la méthode. La dilution de la coloration bleue par l'alcool, après chauffage, ne nous empêche pas de retrouver les résultats d'un mode opératoire primitivement choisi (1cm³ de furfural à 0,9 p.100, chauffage de 15 minutes seulement, ni alcool ni acide acétique).

CONJUGAISON IN OVO DE L'ACIDE CHOLIQUE A LA TAURINE : DETERMINATION
DES ACTIVITES ENZYMATIQUES -

La conjugaison des acides biliaires procède en deux étapes : formation de cholyl-CoA à partir de cholate et de CoA, formation de taurocholate à partir de cholyl CoA et de taurine ; nous avons étudié chez l'embryon de Poulet, la résultante de ces deux réactions. Nous avons déterminé la date d'apparition in ovo de taurocholate marqué avec administration de cholate¹⁴C à l'embryon.

- 0 -

Date d'apparition de la conjugaison in ovo. Une dose traceuse (0,2 μ C ; a.s. 0,05 millicuries/ 1,41mg) de cholate marqué en solution dans 0,3 ml de sérum physiologique est déposée, au 3ème jour d'incubation, sur la membrane chorioallantoïdienne antérieurement préparée selon la technique de ZWILLING(*). Du 5ème au 11ème jour, les lots d'embryons avec leurs liquides amniotique et allantoïdien sont fixés par l'éthanol en présence de cholate et de taurocholate entraîneurs. Les chromatogrammes des extraits alcooliques non hydrolysés permettent la détection des produits de conjugaison du cholate marqué par autoradiographie et passage au "scanner".

(*)- Au cours des premières 24 heures d'incubation, l'oeuf étant placé horizontalement sur un support, on perce successivement la chambre à air et l'extrémité opposée de l'oeuf par laquelle on prélève 2 à 3 ml d'albumen. On découpe ensuite dans la coquille et la membrane coquillière une fenêtre d'un 1/2 cm² que l'on referme avec un carré de "scotch tape". La membrane chorioallantoïdienne se développe au-dessus de l'aire embryonnaire affaissée sans adhérer à la membrane coquillière.

TECHNIQUES ISOTOPIQUES -

Nous avons utilisé pour la détection autoradiographique un film Kodirex avec un minimum de 15 jours de pose. Nous avons effectué nos comptages avec deux types d'appareil : un compteur à méthane sans fenêtre (FRIESEKE et HOEPFNER) et un compteur à scintillation (UNILEVER NUCLEAR CHICAGO). Les résidus de dessiccation analysés au compteur à méthane sont limités de façon à éviter l'autoabsorption. Le silicagel contenant la radioactivité est mis en suspension dans un gel thixotropique dont la composition est la suivante avant l'examen au compteur à scintillation :

- 5 g de 2-5-diphényl oxazol (P-P.O),
- 0,3 g de p.bis (2 (5 phényl oxazolyl)) Benzène
(PO POP)
- 40 g de Cab. O-Sil.
- q.s.p. 1 litre de toluène.

2)- RESULTATS EXPERIMENTAUX -

A)- DATE D'APPARITION, NATURE ET EVOLUTION DES ACIDES BILIAIRES -

Nous exposerons successivement nos résultats espèce par espèce en y ajoutant dans le cas du lapin et du poulet quelques données sur l'évolution des poids corporel et hépatique au cours du développement.

RAT (gestation 22-23 jours, la présence de spermatozoïdes dans le frottis vaginal correspond au 1er jour de la gestation).

L'utilisation des réactifs chimiques n'a pu mettre en évidence l'acide cholique sur les chromatogrammes avant le 21ème jour de la vie foetale, c'est-à-dire la veille ou l'avant veille de la mise-bas. A ce stade, on ne trouve par foetus que de très faibles quantités : 10 µg d'acide cholique dans le tractus digestif et 3 µg dans le foie. Cet acide biliaire se trouve sous forme de tau

roconjugué. Nous n'avons pas cherché à détecter la présence d'acide chénodésoxycholique, acide biliaire secondaire du rat adulte, ni celle de composés conjugués à la glycine.

Pour augmenter la sensibilité de détection, $1\mu\text{g}$ de cholestérol-4- ^{14}C a été administré quotidiennement à des rattees gravides à partir du sixième jour de la gestation. Cette dose de radioactivité était mélangée au régime habituel et intégralement ingérée. Les femelles ont été sacrifiées aux 19ème, 18ème et 16ème jour post-coïtum, les foetus prélevés, l'ensemble des foies et tractus digestifs foetaux a été broyé et précipité par l'alcool en présence d'1 mg de taurocholate et de 1 mg de cholestérol entraîneurs. Après délipidation de l'extrait, une première chromatographie a été effectuée, la zone correspondant à l'acide taurocholique a été découpée, l'acide biliaire a été hydrolysé et une seconde chromatographie en couche mince a été effectuée dans le système utilisé pour les acides biliaires libres. L'autoradiographie a montré que l'acide cholique provenant de foetus prélevés au 19ème jour post-coïtum était radioactif et ce très faiblement, malgré un temps de pose très long. L'autoradiogramme a montré également la présence d'une seconde zone radioactive, correspondant à une substance moins polaire que l'acide trihydroxylé. Nous n'avons pas déterminé sa nature.

Le TABLEAU n° II rend compte de l'évolution des acides biliaires chez le Rat. Alors qu'au 21ème jour post-coïtum, on ne trouve que des traces d'acide cholique total (moins de $13\mu\text{g}$ par foetus), cette quantité augmente brusquement avant la naissance pour atteindre $200\mu\text{g}$ par foetus sacrifié au 22ème jour de la gestation. Cette augmentation se poursuit au début de la vie post-natale : chez le raton nouveau-né sacrifié au 23ème jour après l'accouplement, on dose 300 à $400\mu\text{g}$ d'acide cholique après hydrolyse, que les petits soient nés de la veille ou le jour même,

qu'ils aient ingéré ou non du lait maternel.

- TABLEAU n° II -

Dosage de l'acide cholique chez le rat

PORC - (gestation 115 jours, le coït correspond au premier jour de la gestation). Les acides biliaires apparaissent dans les extraits du tractus digestif et des vésicules biliaires entre le 55ème et le 65ème jour post-coïtum (détection par les réactifs chimiques). Les acides biliaires sont les mêmes que ceux de la bile vésiculaire du Porc adulte (acides chénodésoxycholique, hyodésoxycholique, hyocholique et cholique) et se trouvent sous forme de conjugués à la glycine et à la taurine, avec prédominance des premiers. On ne voit pas de différence, d'ordre qualitatif, entre les chromatogrammes correspondant aux extraits de foetus de 100 jours, de foetus à terme, de porcelets nouveau-nés ou de porcs sevrés. Nous reviendrons plus loin sur cette observation.

COBAYE (64-66 jours). Les quelques essais effectués sur les extraits hydrolysés ont permis de détecter des traces d'acides biliaires entre le 45ème et le 50ème jour. La tache principale correspond à l'acide chénodésoxycholique.

Nous n'avons pas , pour ces deux dernières espèces, étudié l'évolution quantitative des acides biliaires foetaux.

LAPIN (gestation 32-33 jours. Le coït correspond au premier jour de la gestation) .

Evolution pondérale des embryons et des foies . On remarque au sein d'une même portée une dispersion importante du poids des individus. Par contre le rapport poids du foie/poids du corps est à peu près constant. Cependant le développement du foie embryonnaire ne suit pas exactement la croissance pondérale du foetus et la valeur du rapport s'élève jusqu'au 22ème jour de la gestation, se fixe ensuite en plateau et diminue au moment de la naissance.

Dosage de l'acide cholique chez le rat

Age à partir de l'accouplement	Foetus prélevés in utero		Acide cholique total en microgrammes par foetus
	N° des portées	Nombre d'animaux	
18ème jour	WAG 5.....	7	Absent
20ème jour	{ WAG 6.....	7	Présence douteuse
	{ WAG 25,26,27,28.....	18	Absent
21ème jour	{ WAG 1.....	5	Moins de 10 g
	{ WAG 3.....	5	
	{ WAG 8.....	11	
	{ WAG 7,13,14,15.....	29	
22ème jour	WAG 23 :		
	{ Sacrifice immédiat.....	5	192
	{ Après 3h30 à 32°C.....	5	209
	CF 23 :		
	{ Sacrifice immédiat.....	6	160
	{ Après 3h30 à 32°C.....	5	149
	CF 8 :		
	{ Sacrifice immédiat.....	5	196
	{ Après 3h30 à 32°C.....	5	190
Ratons nouveau-nés tués au 23ème jour			Acide cholique total en microgrammes par raton
Nés au 22ème jour	WAG 11 :		
	Sacrifiés après 15h.....	4	405
	" " 24h.....	4	309
Nés au 23ème jour	CF 2.....	3	236 (b)
Nés au 23ème jour	WAG 20 :		
	Sacrifice immédiat.....	3	304
	Après 6h à 37°C.....	2	305 (c)

(a) Nourris

(b) Mise-bas laborieuse

(c) Jeûne

Une évolution identique avait été décrite par BARCROFT dans le cas de la Brebis.

- TABLEAU n° III -

Evolution pondérale des foetus de lapins et de leur foie.

Rapport Poids du foie/Poids du corps
(Géant de Bouscat)

Date d'apparition , nature et évolution des acides biliaires. Des traces d'acide cholique ont été décelées, dans les extraits hydrolysés, au 22ème jour de la vie intra-utérine. Au 23ème jour, le tractus digestif et la vésicule contiennent au total moins de 8µg d'acide cholique, dont la forme de conjugaison à cette date n'a pas été déterminée. Au 24ème jour, les chromatogrammes révèlent aussi la présence d'acide désoxycholique et, également, dès ce stade, celle d'une substance moins polaire que l'acide désoxycholique, présentant lors de la révélation les mêmes caractéristiques de coloration que l'acide biliaire qu'elle accompagne. Comme chez l'adulte, les acides biliaires sont conjugués à la glycine. A aucun moment du développement foetal n'ont pu être détectés de tauroconjugués ou d'acides biliaires libres.

Le TABLEAU n° IV montre une augmentation de l'acide cholique du 23ème au 26ème jour, suivi d'un palier jusqu'au 28ème jour de la vie intra-utérine. Au 32ème jour, l'acide cholique total s'est élevé à treize fois la valeur atteinte au 28ème jour. (nous ne disposons que d'une seule portée pour cette date). Cet accroissement se poursuit après la naissance, les valeurs triplant environ en trois jours. L'acide désoxycholique présente également

- TABLEAU n° IV -

Cholestérol total hépatique et acides biliaires au cours du développement foetal et néonatal du lapin

- TABLEAU III -
Evolution pondérale des foetus de lapine et de leur foie. Rapport Poids du foie/Poids du corps
(Géant de Bouscat)

Numéro de la lapine	Jours post-coi- tum ou post-par- tum	Nombre d'embryons	Poids moyen de l'embryon (g)	Poids moyen du foie (g)	Poids du foie Poids du corps
L 2	17	1	0,62	0,023	0,037
L 1	21	1	3,93	0,259	0,068
L 3	21	4	3,49	0,246	0,072
L 5	22	9			
L 6	22	9	4,59	0,425	0,092
L 7	22	13	4,97	0,483	0,098
L 8	22	8	5,01	0,467	0,093
L 14	23	11	7,73	0,78	0,1
L 9	24	9	9,70	0,999	0,103
L 10	24	11	9,95	0,780	0,079
L 11	26	12	18,3	1,372	0,075
L 12	26	8	15,6	2,109	0,13
L 13	27	9	28,1	1,85	0,068
L 15	27	4	43,2	3,66	0,084
L 16	27	7	22,1	1,91	0,086
L 17	27	5	22,0	2,046	0,093
L 12	28	9	28,6	2,099	0,073
L 4	32	9	68,2	3,92	0,057
L 20	32	11 (3 3 5)	47,3 47,9 50,6	2,81 2,70 3,117	0,059 0,058 0,061
L 19 L 21	Nouveau nés (13.1/2 (23.1/2 (33.1/2	6 3 3 3	62,5 71,7 77,3 68,0	2,98 3,16 3,32 2,89	0,048 0,044 0,041 0,042

- TABLEAU IV -

Cholestérol total hépatique et acides biliaires au cours du développement foetal et néonatal du lapin

Jours post-coitum et jours post- partum - nombre de foetus par portée - nombre de dosages par portée	Cholestérol total hépati- que par foetus (mg)	Cholestérol total hépati- que par g de foie frais (mg)	Acide cholique par foetus μg	Acide cholique par g de foie μg	Acide désoxy- cholique par foetus μg	Acide désoxy- cholique par g de foie μg
22 (9) 3	0,75	1,79	-	-	-	-
22 (13) 4	0,90	1,88	-	-	-	-
22 (8) 3	0,93	1,99	-	-	-	-
23 (11) 4	1,32	1,88	traces	traces	-	-
24 (9) 3	1,31	1,31	10,5	10,5	-	-
24 (11) 4	1,57	2,01	9,5	12,2	-	-
26 (11) 4	3,15	2,29	48,0	35,9	-	-
26 (8) 3	2,92	1,39	25,0	12,3	-	-
27 (9) 3	4,24	2,29	82,0	44,8	-	-
27 (4) 2	10,03	2,74	90,0	24,6	-	-
27 (7) 3	4,61	2,41	26,3	13,7	-	-
27 (5) 2	4,64	2,26	45,0	22,0	-	-
28 (9) 3	4,62	2,21	58,0	27,6	-	-
32 (9) 3	7,7	1,98	863	243	360	91,8
32 (11) 2	4,85	1,68	705	251	450	-
			800	296	430	-
Nouveau-nés (6) 2	6,05	1,96				
1j.1/2(9) 3	7,60	2,42	1800	571	529	168
2j.1/2(9) 3	8,36	2,51	1958	592	400	121
3j.1/2(9) 3	7,96	2,75	2667	922	530	184

une augmentation entre le 28ème et le 32ème jour, qui, elle, cependant, ne se poursuit pas après la naissance. Nous expliquerons plus loin cette différence. L'acide désoxycholique peut représenter au 27ème jour la moitié, et au 32ème jour plus du tiers des acides biliaires du fœtus. On peut suivre sur le chromatogramme représenté par la Figure n° 8 l'évolution des acides cholique et désoxycholique avant la naissance.

- FIGURE n° 8 -

POULET (21 jours d'incubation à 38°C).

Evolution pondérale des embryons et des foies . Rappelons qu'il s'agit d'une souche "COUCOU MARANS". Le TABLEAU n° V donne l'évolution pondérale des embryons et de leur foie et celle du rapport poids du foie/poids du corps. Nous observons que ce rapport reste constant pendant le cours de l'embryogénèse et qu'il est moins élevé que dans le cas de la gestation du lapin. Nous n'en tirons évidemment aucune conclusion.

- TABLEAU n° V -

Evolution pondérale des embryons de poulet et de leur poids.
Rapport poids du foie sur poids du corps (Cocou Marans)

Date d'apparition, nature et évolution des acides biliaires .
Recherchée dans les extraits hydrolysés, la présence d'acide chéno-désoxycholique, acide biliaire principal de l'animal adulte, a été détecté à partir du 11ème jour d'incubation (environ 2µg par embryon). Au 12ème jour, la chromatographie avant hydrolyse révèle la présence d'acide taurochéno-désoxycholique et d'acide taurocholique. Les chromatogrammes provenant d'embryons plus âgés montrent la présence d'une substance moins polaire que l'acide chéno-désoxycholique, présentant les mêmes caractéristiques que lui lors de la révélation.

- FIGURE n° 8 -



Photographie en U.V. d'un chromatogramme en couche mince. De gauche à droite : trois dépôts témoins d'acide désoxycholique, acides biliaires hydrolysés d'embryons de 27 jours, dépôt témoin d'acide cholique, a.b. hydrolysés d'embryons de 32 jours, a.b. hydrolysés d'embryons de 26 jours, trois dépôts témoins d'acide cholique.

D'une portée à l'autre, acides cholique et désoxycholique restent dans le même rapport.

- TABLEAU V -

Evolution pondérale des embryons de poulet et de leur foie. Rapport poids du foie sur poids du corps
(Coucou Marans) Les chiffres marqués d'un * concernent la souche "Leghorn"

Jours d'incubation et âge des poussins	Nombre d'oeufs	Poids moyen de l'embryon (g)	Poids moyen du foie (g)	Poids du foie / Poids du corps
12	10	4,63	0,100	0,0237
13 *	14	7,5	0,890	0,0255
16	5	16,89	0,390	0,0231
16 *	15	13,6	0,301	0,0218
17	2			
18	1	12,5	0,447	0,0229
18	5	27,0	0,532	0,029
19	2	18,2	0,368	0,0202
19	1	25,3	0,556	0,022
19 *	9	20	0,480	0,024
20	1	27,0	0,620	0,0204
Nouveau-né	1	28,5	0,599	0,021
Nouveau-né	2	50,7	0,802	0,0159
Nouveau-né	2	49,50	0,648	0,013
Nouveau-né *	11		0,573	0,018
2 jours *	9		0,927	0,0237
3 jours	1	47,0	1,652	0,0353
3 jours	2	40,0	1,518	0,038
3 jours	2	38,50	1,137	0,029
6 jours	2	49,50	2,099	0,042
7 jours	4	51,8	2,3	0,044

Les chromatogrammes effectués avec des extraits non hydrolysés révèlent que les acides biliaires se trouvent sous forme de tauroconjugués. Nous n'avons pas décelé d'acides biliaires conjugués à la glycine.

En outre, nous avons administré du cholate marqué à l'oeuf embryonné par injection intravitelline au 11ème jour d'incubation et par dépôt sur la membrane chorioallantoïdienne à partir du 3ème jour : les seuls produits marqués retrouvés sur les chromatogrammes ont été les acides cholique et taurocholique.

Après injection intravitelline de cholestérol marqué au 11ème jour ou 18ème jour, nous avons examiné par autoradiographie les chromatogrammes des extraits non hydrolysés de vésicules biliaires et de tube digestif : nous n'avons pas décelé de radioactivité au niveau d'éventuels conjugués à la glycine.

Cette injection de cholestérol a par ailleurs permis de démontrer que la substance, moins polaire que l'acide chénodésoxycholique évoquée plus haut, était bien un acide biliaire. L'examen par autoradiographie des chromatogrammes des extraits avant ou après hydrolyse montre que cette substance est radioactive et qu'elle préexiste avant hydrolyse sous une forme que son Rf désigne comme un tauroconjugué légèrement moins polaire que l'acide taurochénodésoxycholique.

Le TABLEAU n° VI montre qu'après une montée rapide entre le 11ème et le 16ème jour, l'acide chénodésoxycholique s'élève progressivement jusqu'au 20ème jour, veille de l'éclosion. Le poussin en train d'éclore ou frais éclos contient de 1 à 3 mg de cet acide, c'est-à-dire 2 à 6 fois plus que l'embryon de la veille.. L'augmentation se poursuit pour atteindre 7 mg au 6ème jour. L'acide cholique augmente également; représente entre 20 à 25p.100 des

acides biliaires totaux ; le rapport acide chénodésoxycholique / acide cholique est donc pratiquement constant.

- TABLEAU n° VI -

Cholestérol total hépatique et acides biliaires au cours du développement embryonnaire et néonatal du Poulet

La brutale augmentation prénatale des acides biliaires notée chez le Rat, le Lapin et le Poulet ressort également quand on rapporte les résultats au poids frais de tissu hépatique. Dans le cas du Poulet, en raison de la surcharge lipidique du foie, le phénomène eût été marqué si les acides biliaires dosés avaient été rapportés au poids de l'organe délipidé ou à son ADN.

B)- EVOLUTION DU CHOLESTEROL TOTAL HEPATIQUE DU FORTUS DE LAPIN ET DE L'EMBRYON DE POULET

L'apparition des acides biliaires ou l'augmentation de leur sécrétion coïncide-t-elle avec une variation de la concentration de leur précurseur ? Pour répondre à cette question il a été procédé à des dosages de cholestérol total hépatique au cours du développement chez le fœtus de lapin et l'embryon de poulet.

Dans le cas du Lapin, il ne s'accumule pas de quantité notable de cholestérol total dans le foie, au cours du développement fœtal, ni dans les heures qui suivent la naissance (TABLEAU n° III). La quantité totale par foie, dosable à partir du 22ème jour, croît linéairement avec le temps jusqu'au 3ème jour post-natal (FIG.n° 9).

- FIGURE n° 9 -

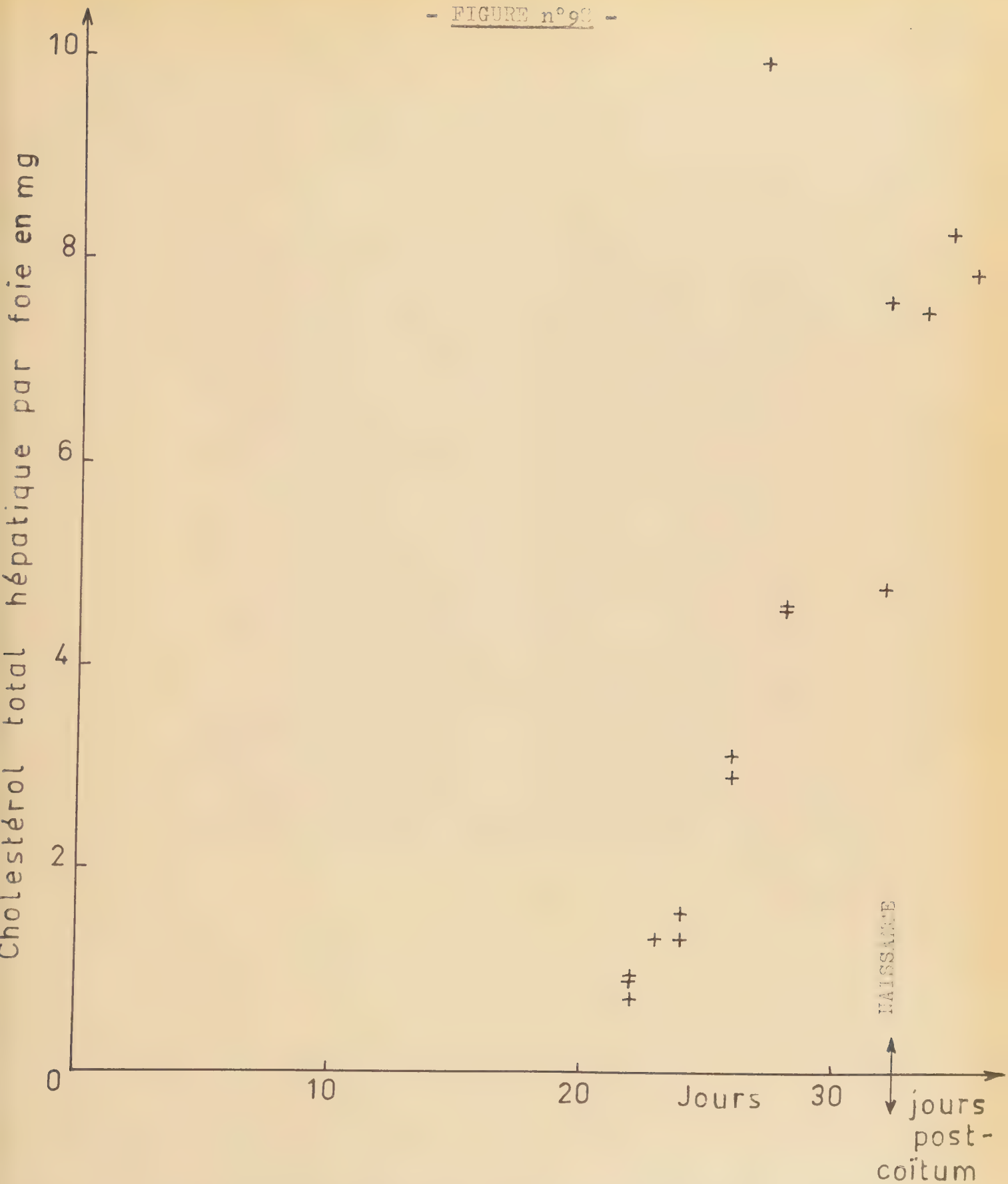
Le TABLEAU n° VI rend compte des dosages de cholestérol effectués sur des foies embryonnaires de Poulet en fonction de

- TABLEAU VI -

Cholestérol total hépatique et acides biliaires au cours du développement embryonnaire et néonatal du Poulet

Jours d'incubation des séries d'embryons dosés Age des poussins (nombre d'animaux par série)	Cholestérol hépatique total (mg)	Cholestérol hépatique par g de foie (mg)	Acide chenode- soxycholique/ embryon μg	Acide chenode- soxycholique g foie μg	Acide choli- que p. embryon μg	Acide cholique p. g foie μg
12 (10)	-	-	2,0	20		
13 (5)			3,5	27		
15 (5)	8,6	22,0	262,45	700		
16 (5)			70	280	25	100
17 (3)	9,35		208			
18 (1)	13,1	29,5	318,25	712		
18 (5)	16,8	31,6				
19 (3)			270	630		
19 (2)	14,2	28,4	452,2	1228		
19 (1)	25,9	46,5	570	1002		
20 (1)	-	-	476	770		
Nouveau-né(1)	44,6	74,5	3000	5000		
Nouveau-né(2)	48,4	60,2	2650	3304	800	1000
Nouveau-né(3)			570	875	200	330
Nouveau-né(2)	47,2	72,7	1005	1550	351	541
+1 (3)			915	1520	210	335
+3 (1)	88,9	53,7	4747	2873	1300	787
+3 (2)	59	38,8	4900	3234	1280	643
+3 (2)	54,9	47,3				
+6 (2)	55,2	26,6	7035	3350		
+7 (4)	64,5	27,9				

- FIGURE n°98 -



Cholestérol total hépatique au cours du développement foetal et néonatal du Lapin Géant de Bouscat.

l'âge. Il confirme les résultats déjà publiés par d'autres auteurs (25,26,27,28,29) : le foie accumule une quantité énorme de cholestérol en fin d'incubation. La quantité totale de cholestérol par foie augmente encore du 16ème jour de l'incubation à la naissance et poursuit son ascension jusqu'au troisième jour ; les valeurs trouvées au 6ème-7ème jour après l'éclosion sont proches de celles du 3ème jour ; il n'y a pas chute de la quantité totale de cholestérol hépatique. Par contre, la concentration de cholestérol (FIG n° 10) dans le tissu hépatique augmente jusqu'à l'éclosion, passe par un maximum chez le poussin nouveau-né et diminue lentement dans les jours qui suivent .

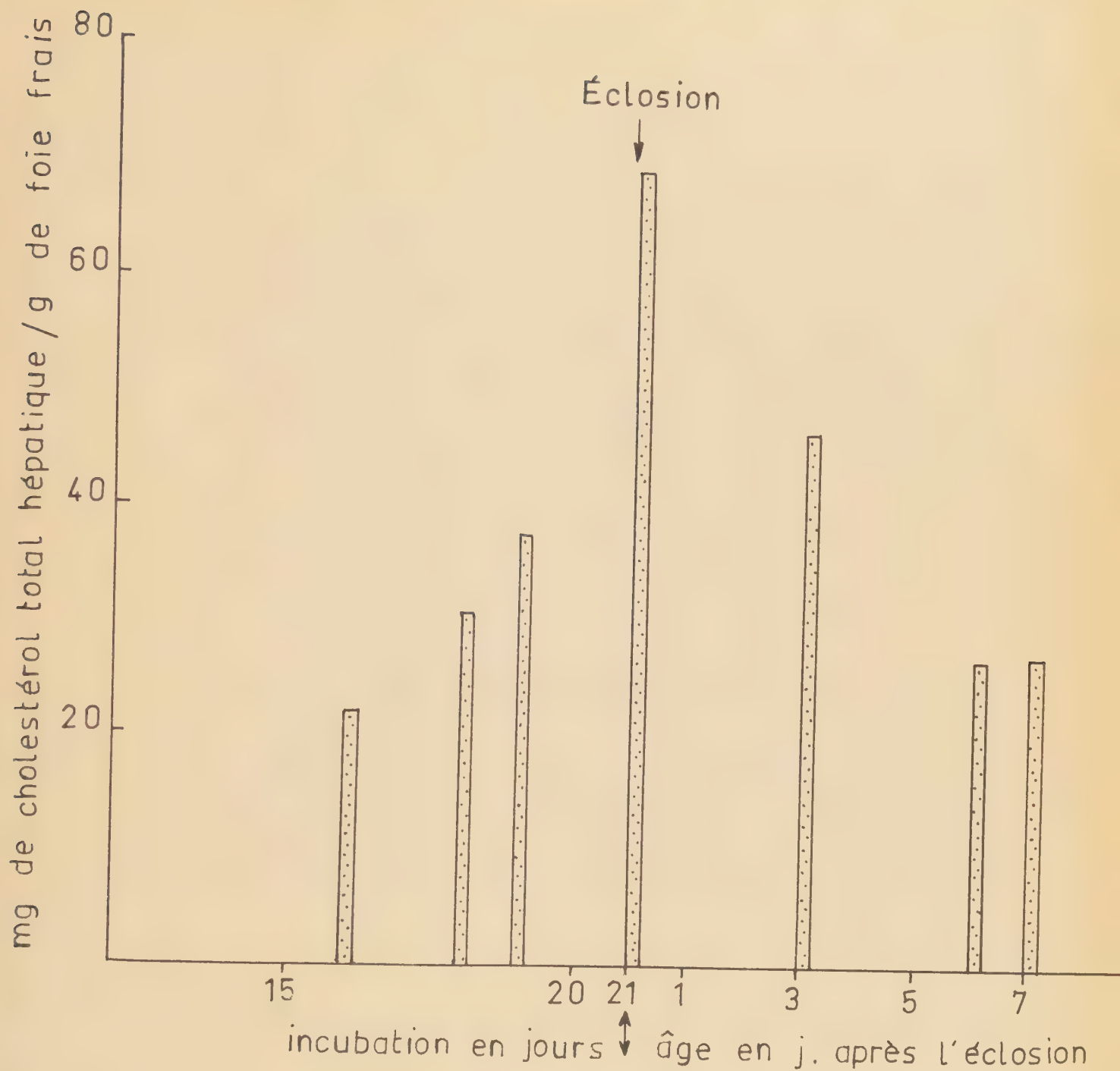
- FIGURE n° 10 -

C)- ORIGINE DES ACIDES BILIAIRES -

La présence d'acides biliaires dans l'embryon de Poulet ou les foetus de Mammifères posait le problème de leur origine.

1)- Transfert du cholestérol vitellin, précurseur des acides biliaires chez l'embryon de Poulet.

Chez le Poulet le cholestérol de l'embryon provient en majeure partie des réserves vitellines et, pour une faible part, du cholestérol synthétisé par le sac vitellin. Ces deux sources se confondent-elles en une seule et le cholestérol de réserve du vitellus peut-il se transformer en acides biliaires après son transport au foie ? Ou bien, ce qui est improbable, le cholestérol de synthèse forme-t-il un compartiment métabolique séparé, source unique des acides biliaires ?



Evolution de la concentration du cholestérol total
hépatique au cours du développement embryonnaire
et néonatal du Poulet

Nous avons effectué au 10ème ou au 18ème jour d'incubation une injection intravitelline d'une suspension colloïdale de cholestérol-4-¹⁴C (dose traceuse stabilisée par une trace de Tween 80). Nous avons prélevé le foie embryonnaire respectivement au 14ème et au 21ème jour ; on y retrouve jusqu'à 15p.100 du cholestérol radioactif injecté. Les chromatogrammes effectués à partir de la fraction " acides biliaires " des vésicules et tractus digestifs ont montré trois zones radioactives correspondant respectivement aux acides cholique, chénodésoxycholique et à l'acide biliaire indéterminé dont nous avons signalé la présence plus haut. Cette expérience montre que le cholestérol vitellin peut être transporté au foie et transformé en acides biliaires et que ceux-ci ne dérivent pas exclusivement du cholestérol de synthèse qui constituerait un compartiment indépendant sans échange possible avec le cholestérol d'origine vitelline.

2)- Origine maternelle d'une partie des acides biliaires foetaux chez le Lapin et le Porc.

L'acide biliaire principal de la bile du lapin adulte est l'acide désoxycholique (3-12 dihydroxycholanique), produit par la flore digestive à partir de l'acide cholique (3,7,12 trihydroxycholanique) originellement synthétisé par le foie. L'acide désoxycholique, absorbé par l'intestin, est renvoyé au foie qui ne peut le transformer en acide cholique. Il passe alors dans la bile avec un peu d'acide cholique néoformé. Le cycle entéro-hépatique se répète de telle sorte que la vésicule biliaire contient environ dix fois plus d'acide désoxycholique que d'acide cholique et la proportion du cholate diminue encore dans le tube digestif et le sang.

L'acide biliaire principal du fœtus de lapin est, certes, l'acide cholique, mais nous avons vu que l'on trouve dans sa

bile une proportion importante d'acide désoxycholique (TABLEAU n°IV). Si les acides biliaires accusent tous deux une forte augmentation entre le 28ème et le 32ème jour, seul l'acide cholique poursuit son ascension dans les jours qui suivent la naissance quand l'organisme foetal a cessé d'être tributaire de la circulation maternelle et lorsque la flore digestive est encore restreinte.

D'autre part, la bile du Porc adulte contient de l'acide hyodésoxycholique (3-6 dihydroxycholanique) que l'on sait être produit par la flore digestive à partir de l'acide hyocholique (3,6, 7 trihydroxycholanique) synthétisé par le foie (57). Or les acides biliaires détectés sur nos chromatogrammes étaient identiques, que les échantillons analysés proviennent de foetus de 65 jours, de 70 jours, de 115 jours, de porcelets nouveau-nés ou d'un porc de quelques mois. La bile foetale contient donc, selon nos critères, de l'acide hyodésoxycholique.

Ces faits suggèrent le passage d'acides biliaires du sang maternel au foetus à travers le placenta. L'utilisation de cholate marqué a permis de prouver, dans le cas du lapin, l'origine maternelle de l'acide biliaire foetal.

L'expérience a été effectuée successivement sur deux lapines. La lapine n° 1 reçoit quotidiennement par voie sous-cutanée pendant les cinq derniers jours de la gestation une dose traçeuse de cholate 24^{14}C (correspondant à 1.650.000 i.p.m. avec le compteur utilisé). Les sept lapereaux, nés inopinément après la cinquième injection, furent sacrifiés quelques heures après la naissance. Les acides biliaires contenus dans leur vésicule et leur tractus digestif étaient légèrement radioactifs (5.200 i.p.m. pour l'ensemble des lapereaux 1,2,3 et 4 - 5.000 i.p.m. pour l'ensemble des lapereaux 5,6 et 7). L'examen autoradiographique des chromato-

grammes des acides biliaires hydrolysés a montré que la radioactivité correspondait à l'acide désoxycholique et à la substance polaire qui l'accompagne ; la zone de l'acide cholique n'était pas radioactive.

Comme la présence d'acide désoxycholique marqué dans le cycle entéro-hépatique de ces lapereaux eût pu être mis au compte du lait maternel retrouvé dans leurs estomacs, nous avons administré du cholate radioactif à une seconde lapine gestante (1.650.000 i.p.m. au 30ème jour, 3.300.000 i.p.m. le 31ème jour). Au 32ème jour, l'animal a été sacrifié et onze foetus ont été prélevés in utero . Les extraits de vésicule et de tractus digestif ont été hydrolysés et délipidés en groupant les organes correspondant à deux ou trois foetus. L'examen au compteur a révélé la présence de substances radioactives dans chacun des groupes :

- 2.760	i.p.m. pour les foetus 1,2,3
- 1.680	i.p.m. pour les foetus 5,5,6
- 2.340	i.p.m. pour les foetus 7,8,9
- 1.260	i.p.m. pour les foetus 10 et 11 soit au
<u>total</u> :.....	<u>8.000</u> i.p.m. pour la portée

L'autoradiogramme a aussi montré que la radioactivité était contenue dans l'acide désoxycholique et l'acide biliaire moins polaire qui l'accompagne. Aucune radioactivité n'a pu être décelée dans l'acide cholique foetal. L'acide désoxycholique du foetus est donc d'origine maternelle. En outre, les expériences montrent que la substance moins polaire qui l'accompagne est un acide biliaire, dérivant probablement comme lui de l'action de la flore digestive maternelle sur l'acide cholique. Rappelons que la quantité d'acides biliaires contenus dans le tractus digestif d'un lapin adulte est considérable, de l'ordre de 700 mg selon HELLSTRÖM et SJÖVALL, (58); ce volant a dû beaucoup diluer le peu de cholate marqué injecté, d'autant plus que l'état d'équilibre

isotopique était loin d'avoir été atteint dans ces expériences. Cela explique pourquoi le transfert de radioactivité a été minime.

Malgré l'absence de preuve directe et la différence des types placentaires chez la lapine et la truie, l'origine maternelle de l'acide hyodésoxycholique trouvé dans les foetus de Porc semble probable. Quant au Rat, il est possible qu'une partie de l'acide cholique sécrété à la fin de la gestation dans le tractus digestif foetal provienne de la mère. On sait que dans le foie du rat, contrairement à celui du lapin, existe une 7-hydroxylase qui transforme l'acide désoxycholique en acide cholique, ce qui explique l'absence chez le Rat d'acide désoxycholique chez le foetus comme chez l'adulte.

Une fraction des acides biliaires trouvés dans le tractus du foetus est donc d'origine maternelle, chez certains mammifères du moins. Mais il n'en demeure pas moins que la majeure partie doit être synthétisée in situ par le foie foetal : c'est bien l'acide cholique et non l'acide désoxycholique, qui, chez le foetus de lapin à l'inverse du lapin adulte constitue l'acide biliaire principal de la bile.

D)- CONJUGAISON DE L'ACIDE CHOLIQUE A LA TAURINE AU COURS DU
DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DU POULET -

Date d'apparition de la conjugaison in ovo . Après administration de cholate 24^{14}C à l'oeuf embryonné nous n'avons pu déceler des traces de taurocholate marqué avant le 6ème jour d'incubation. Dès le 7ème jour la proportion de la radioactivité retrouvée dans la zone du chromatogramme correspondant au taurocholate croît sensiblement.

3)- DISCUSSION -

Nous discuterons successivement la signification de la date d'apparition des acides biliaires, puis l'interprétation qui peut être donnée à leur accroissement prénatal. Nous examinerons enfin les problèmes que pose l'étude de la conjugaison des acides biliaires in vivo chez l'embryon de poulet. Nous tirerons quelques conclusions du passage transplacentaire des acides biliaires de la mère au fœtus.

Date d'apparition - Des traces d'acides biliaires ont pu être décelées pour la première fois au 19ème jour post-coïtum chez le fœtus de rat, au 22ème jour chez le lapin, entre le 55ème et le 65ème jour chez le porc, vers le 45-50ème jour chez le cobaye, au 11ème jour d'incubation enfin chez l'embryon de poulet.

La précision de ces dates dépend de la sensibilité de la méthode analytique employée (Rappelons que cette méthode permet de déceler des quantités d'acides biliaires de l'ordre de 3 à 5 µg)

Correspondent-elles vraiment à un démarrage de la biosynthèse des acides biliaires chez le fœtus ? N'y a-t-il pas, antérieurement, formation d'acides biliaires qui ne pourraient s'écouler vers l'intestin et, éventuellement, vers la vésicule, faute d'un système excréteur adéquat. Le foie embryonnaire serait en état de rétention physiologique et les acides biliaires gagneraient le sang fœtal et, via le placenta, le système circulatoire maternel, pour être excrété vers la bile par le foie de la femelle gestante. Cette explication pourrait trouver appui dans les observations histologiques de WILSON et de PETERS (59,60) faites au cours du développement du foie fœtal de la Souris. Ces auteurs ne distinguent pas de différenciation des canalicules biliaires et du système

de drainage biliaire intrahépatique avant le 14ème-15ème jour de la gestation. Or la sécrétion biliaire a déjà débuté à cette date si l'on en juge par la présence, depuis plusieurs jours de pigments biliaires dans le contenu intestinal. Néanmoins, l'embryon de Poulet ne se prête pas à cette interprétation: aucune trace d'acide biliaire n'a pu être mise en évidence dans le liquide allantoïdien, malgré l'immaturité du système des canalicules biliaires.

Si la mise en évidence des acides biliaires dans le système digestif foetal révèle bien la date d'apparition de produits synthétisés localement, quelle en est la signification ? Est-elle due à la multiplication des cellules hépatiques déjà matures, au remplacement du tissu hématopoïétique par le parenchyme ? Elle traduirait alors l'augmentation du nombre des unités fonctionnelles déjà actives. Ou bien révèle-t-elle l'entrée en activité des cellules qui, jusqu'alors, n'ont pas terminé leur différenciation ? La date d'apparition des acides biliaires correspondrait dans ce cas à un tournant du développement fonctionnel des hépatocytes.

Il semble que les dates où nous avons vu apparaître les acides biliaires foetaux correspondent chez les Mammifères à une période critique où l'on assiste à la raréfaction du tissu hématopoïétique (maturation et départ des cellules sanguines), à la multiplication et à l'évolution cytologique des cellules parenchymateuses, au démarrage dans le foie de l'accumulation de glycogène, test usuel de la maturation biochimique de l'organe, sans que l'on puisse nettement préciser les relations de cause à effet éventuelles entre ces différents aspects de l'organogenèse (61). Cette période critique a été mise en évidence chez le Rat par différents auteurs (62,63,64), chez le Lapin par JOST et SORENSON (65,67) et probablement aussi chez le Cobaye.

En précisant le déterminisme endocrinien de l'accumulation de glycogène dans le foie avant la naissance, JOST et son école (65) ont permis de relier cette période critique à la mise en activité de l'hypophyse foetale. Il semble que chez le Rat l'évolution histologique du foie et l'apparition du glycogène puissent être provoquées par l'action conjuguée du placenta et des corticoïdes. Il y a dissociation entre fonction glycogénique et transformations histologiques, celles-ci n'entraînent pas l'expression totale de celle-là. L'expérimentation n'a pas encore fixé les relations éventuelles entre évolution cytologique des hépatocytes, maturation des cellules-souches sanguines et intervention de l'érythropoïétine sur ce dernier phénomène (67). Toujours est-il que l'apparition des acides biliaires coïncide avec l'entrée en activité de l'hypophyse et du cortex surrénalien du fœtus. Chez le Lapin, dont le placenta n'agit pas sur la fonction glycogénique du foie fœtal, la coïncidence est presque aussi frappante : la teneur du foie en glycogène, déterminée après la décapitation des fœtus à des dates diverses, permet de fixer l'entrée en jeu de l'hypophyse foetale à la période comprise entre le 23ème et le 26ème jour p.c. Rappelons que c'est après le 20ème jour que la maturation des cellules sanguines amène leur départ du foie, c'est au 22ème jour p.c. que nous avons vu apparaître les premières traces d'acide cholique. Notons par ailleurs, que SHEPARD a déterminé la date d'apparition de la thyroxine foetale au 17ème-19ème jour chez le Rat et au 20ème-21ème jour chez le Lapin (68).

Dans le cas du Poulet, l'hématopoïèse est surtout extra-hépatique et le rameniement histologique moins frappant. D'autre part, la période du 10ème-11ème jour ne coïncide pas avec la date d'apparition ou l'augmentation notable du glycogène hépatique. Néanmoins, c'est vers le 11ème-12ème jour que le foie se met à accumuler les lipides, des esters de cholestérol notamment, et on se

rait tenté de relier ces phénomènes à l'apparition des acides biliaires. Cette période correspond aussi au déclenchement de certaines fonctions digestives et endocrines. BRAUER a montré que, si le foie pouvait concentrer de la bromosulfophtaléine-³⁵S à partir du 8ème jour, il ne pouvait l'excréter dans la bile qu'à partir du 11ème jour(69). TONER a pu détecter la sécrétion d'acide chlorhydrique dans le proventricule sous l'effet de l'histamine dès le 11ème jour. C'est à partir du 13ème jour que l'embryon ingère l'albumen (70). La thyroxine apparaît au 10ème jour de l'incubation, en même temps que la formation de colloïde (65). GRILLO enfin met en évidence une forte activité insulinique dans les extraits pancréatiques à partir du 12ème jour (71); or c'est dès le 9ème jour, que R.D. CAHN détecte par des méthodes immunologiques la présence de cette hormone dans des extraits d'embryons (72).

Une observation de N. LE DOUARIN (73) semble montrer que cette période du 10ème-12ème jour d'incubation marque bien un tournant du développement hépatique chez le poulet. Quand on détruit par les rayons X, au stade de 9 à 12 somites, une bande transversale de l'embryon comprise en arrière du 2ème somite, on supprime une région plus ou moins étendue de l'ébauche mésodermique du foie, en laissant intacte l'ébauche endodermique. Celle-ci envahit le reliquat mésodermique, l'induit et subit son induction et il se développe une masse de tissu hépatique d'autant plus réduite que l'étendue mésodermique a été plus largement détruite. Cependant une hypertrophie compensatrice du foie comparable à celle que l'on peut observer chez l'adulte, se déclenche à partir du 10ème jour de l'incubation, c'est-à-dire au moment où la maturation fonctionnelle de l'organe se manifeste et le met sous la dépendance de stimuli régulateurs.

La date d'apparition des acides biliaires semblerait donc, dans le cas du poulet comme chez les mammifères, témoigner

de la maturation fonctionnelle des hépatocytes.

Augmentation prénatale des acides biliaires . L'ascension soudaine des acides biliaires avant la naissance et lors de l'éclosion ne peut s'expliquer par un bouleversement histologique du foie : l'augmentation du nombre relatif ou total des hépatocytes est un phénomène progressif. Elle ne peut être reliée à un accroissement brutal de leur précurseur : la quantité de cholestérol par foie foetal augmente linéairement avec le temps du 23ème jour post-coïtum au 3ème jour après la naissance chez le lapin, et sa concentration ne varie guère; chez le poulet, l'accumulation des esters de cholestérol est déjà notable au 16ème jour d'incubation, quatre jours avant l'accroissement de la production des acides biliaires. Si l'on peut, dans le cas des mammifères, évoquer la levée d'une éventuelle occlusion biliaire physiologique avant la naissance, celle-ci ne peut entrer en ligne de compte chez l'oiseau qui n'accumule pas d'acides biliaires avant l'apparition du cycle entéro-hépatique. Reste une explication : il y aurait avant la naissance ou lors de l'éclosion un accroissement brutal des activités enzymatiques assurant la dégradation du cholestérol et la formation des acides biliaires conjugués. Certains systèmes enzymatiques présentent une augmentation de leur activité lors de la naissance (74). Ainsi en faisant varier la durée de la gestation, A. NEMETH (75) a montré l'influence de la naissance et de la maturité sur l'activité de la tryptophane pyrrolase chez le fœtus de lapin. Cette activité augmente brutalement après une délivrance prématurée . A l'inverse la prolongation de la gestation supprime toute augmentation de cette activité enzymatique. DAWKINS (76) a fait des observations analogues avec la glucose-6-phosphatase chez le Rat. H. BURCH (77), note dans les heures qui précèdent la naissance du Rat, une augmentation importante de l'activité des systèmes enzymatiques responsables de la glycogénolyse, de la formation de glu-

cose libre, de l'utilisation du lactate, de la formation du glycérol phosphate.

La synthèse accrue des acides biliaires et l'excrétion de tauroconjugués expliquent au moins en partie la chute de la concentration du cholestérol hépatique (27,29) qui se produit chez le poulet dans les jours qui suivent l'éclosion, ainsi que celle de la taurine corporelle totale que GARIC et CALET ont noté chez le jeune poussin (78). Rappelons que la régression du foie gras au cholestérol après la naissance du poussin est plus ou moins rapide selon la souche ; le poulet "COUCOU MARANS" étudié ici se classe parmi les races à régression lente : l'excrétion des acides biliaires eût peut être été plus importante si l'on avait utilisé une autre race.

Coucou Marans : le passage transplacentaire des acides biliaires . Il semble que la synthèse hépatique du cholestérol et sa dégradation soient en partie réglée chez l'adulte par la teneur du sang porte en acides biliaires résorbés. S'il en est de même chez le fœtus, le passage transplacentaire des acides biliaires mettrait le métabolisme du cholestérol hépatique fœtal sous l'influence des acides biliaires sanguins - donc du cycle entérohépatique - de la femelle gestante.

Date d'apparition de la conjugaison in ovo chez l'embryon de Poulet
Dès le 6ème jour d'incubation on retrouve sous forme de taurocholate une partie du cholate radioactif injecté au 3ème jour.

La conjugaison du cholate traduit l'activité des deux derniers chaînons enzymatiques du catabolisme du cholestérol, la formation d'acides biliaires conjugués à partir du cholestérol implique l'activité de tous les enzymes intervenant dans cette dégradation. La discordance des deux dates (6ème jour et 11ème jour

pour la date d'apparition des acides biliaires in vivo) s'explique soit par un décalage dans l'apparition des activités enzymatiques, soit par une différence de sensibilité des modes de détection. Il se peut qu'une insuffisance fonctionnelle du système excréteur provoque avant le 11ème jour une stase des acides biliaires néoformés, trop faible pour être détectée mais suffisante pour inhiber les premières étapes du catabolisme du cholestérol. L'existence de ce type de régulation en retour du catabolisme stérolique a été démontrée dans le cas du cycle entérohépatique des acides biliaires chez le Rat adulte (16).

Des essais réitérés n'ont pu mettre en évidence de conjugaison au 5ème jour, 48 heures après injection du traceur. Or, c'est à partir du 3ème jour que les cellules endodermiques issues du bourgeon hépatique envahissent le mésenchyme qui induit leur différenciation en hépatocytes (73). Nos résultats peuvent certes refléter une maturation brutale du parenchyme, mais il est possible qu'avant le 6ème jour l'activité conjugante existe déjà, trop faible pour être détectée compte tenu du petit nombre de cellules différenciées existant à cette date et du raccourcissement du temps de circulation du traceur.

*

* *

*

Dans cette première partie, nous apportons des précisions sur la date d'apparition et la nature des acides biliaires au cours de la vie foetale du rat, du lapin, du porc, du cobaye et chez l'embryon de poulet; nous étudions l'évolution des acides biliaires chez le rat, le lapin et le poulet et celle de leur précurseur, le cholestérol hépatique. Nous montrons dans le cas du lapin et probablement aussi du porc, qu'une part importante

des acides biliaires fœtaux provient de l'organisme maternel.
Nous avons enfin déterminé, chez l'embryon de poulet in ovo, la
date d'apparition de la conjugaison des acides biliaires à la leu-
cine.

*
* *
*

- D E U X I E M E P A R T I E -
=====

L'oxydation du cholestérol en acides biliaires et la conjugaison de ceux-ci avec la taurine et la glycine constituent un des tests de la maturation de la cellule hépatique. Dans la première partie de cet exposé nous avons étudié ces réactions in vivo au cours du développement. Nous avons constaté que la formation des acides biliaires et leur conjugaison pourraient être mises en évidence à une date précoce, du moins chez le poulet. Il est donc probable que le tissu hépatique prélevé tout au début de l'histogenèse manifeste déjà ces activités et on ne peut espérer les faire apparaître de novo en culture . Mais l'accroissement important de ces activités, au moment de la naissance laissait entrevoir la possibilité d'obtenir in vitro leur modulation. Il était nécessaire d'examiner dans quelle mesure elles étaient conservées en culture organotypique puis cellulaire.

Il est évident que la pénétration du cholestérol dans les cellules en culture est un facteur limitant de sa transformation ; elle pose par elle-même un problème de physiologie cellulaire que nous n'avons pas voulu aborder ici (80). Nous nous sommes donc limités au test apporté par la conjugaison des acides biliaires; le cholate ou le désoxycholate sont hydrosolubles et diffusent aisément dans les tissus.

Notons que ce test reflète l'activité des deux systèmes enzymatiques assurant la conjugaison des acides biliaires. Il ne permet aucune déduction quant à la synthèse et la dégradation des protéines enzymatiques en cause. Néanmoins, l'utilisation d'acides biliaires radioactifs confère à ce test une grande sensibilité.

Nous avons d'abord cherché dans quelle mesure le tissu hépatique isolé de l'organisme conservait, en culture organotypique

dans un milieu synthétique, la possibilité de conjuguer les acides biliaires. Nous avons ensuite abordé les cultures cellulaires après trypsinisation. Nos cultures organotypiques et nos premières cultures cellulaires ont porté sur le foie d'embryon de poulet. Nous avons tenté de purifier ces cultures cellulaires par des essais de clonage qui se sont révélés impossibles avec ce matériel expérimental. Nous avons alors utilisé le foie de jeune lapereau à partir duquel nous avons obtenu une culture pure d'apparence parenchymateuse puis le foie de raton nouveau-né qui nous a permis d'isoler en 1968 un clone d'hépatocytes dont la culture se poursuit aujourd'hui.

1)- MATERIEL et TECHNIQUES -

MATERIEL ANIMAL -

Nous avons utilisé des oeufs embryonnés de Leghorn, des lapereaux et des ratons.

TECHNIQUES DE CULTURES -

A)- Culture organotypique de foie embryonnaire de Poulet

Nous avons abandonné après quelques essais la technique de culture organotypique de WOLFF et HAFEN sur milieu gélosé (81) en raison de la diffusion trop lente des produits de la réaction dans le gel. Nous avons alors mis au point une technique de culture sur plate-forme métallique, en milieu liquide, d'après TROWELL (82).

Les explants hépatiques d'un 1/2mm³ environ, sont cultivés 5 à 10 jours à 37°C dans une boîte de pétri sur une grille inoxydable revêtue de papier d'opticien, affleurant à la surface

du milieu, en atmosphère $O_2/CO_2 = 95/5$. Le milieu est du Parker 199 (Institut Pasteur) additionné de taurine ($5 \mu g/ml$), de pénicilline ($50 U/ml$) et éventuellement de 1,5p.100 d'extrait d'embryon de poulet de 10 jours et de 10 p.100 de sérum de veau. Dans les cas où l'expérience se poursuivait plus de 5 jours les explants hépatiques étaient transportés dans un milieu neuf. Le dépôt de la dose de cholate $24^{14}C$ traceur est réalisé par évaporation d'une solution alcoolique.

L'extrait embryonnaire de poulet est préparé stérilement à partir d'embryons de 10 jours broyés dans une seringue après ablation des yeux. Le suc exprimé à travers l'orifice de la seringue, additionné de son volume de liquide de HANKS, est centrifugé à 10.00 tours minutes. Le surnageant est stocké par petites fractions à $-25^{\circ}C$.

B)- Cultures cellulaires -

Le foie (embryons de poulet de 12 jours, lapereaux de 12 et de 14 jours, ratons de 3 à 11 jours) est découpé en fragments d'un mm^3 environ à l'aide d'un scalpel à cataracte. Il est incubé sans agitation, 35 minutes à $37^{\circ}C$, avec 15 ml de la solution saline G(*) de PUCK sans Ca^{++} ni Mg^{++} à 0,1p.100 de trypsine (Pasteur ou Difco) à pH 7,6. La solution de trypsine est décantée par aspiration et les fragments lavés deux fois de suite par 15 ml de milieu de culture glacé à 5 p.100 de sérum de veau (pH 7,3). On procède enfin à la dissociation des fragments à la pipette dans 10 ml de milieu à 5 p.100 de sérum de veau. La suspension cellulaire est filtrée à travers un tamis de nylon (nitex : 4 à 6 couches de mailles de 20μ dans le cas du poulet, 6 couches de mailles 53μ dans le cas du rat (**)) et du lapin). Les cellules

(*)- Saline G : NaCl 8; HCl 0,4 ; $MgSO_4, 2H_2O$ 0,154; $CaCl_2, 2H_2O$, 0,192; $H_2K_2P_2O_7$ 0,150; Glucose, 1,10 ; Rouge de phénol, 0,0012; eau bidistillée q.s.p., 1 l; ajuster à pH 7,4.

(**)- Nous avons vu plus tard qu'il était préférable d'utiliser 3 couches de 30μ .

sont comptées à l'aide d'un hématimètre et amenées éventuellement à la dilution adéquate.

Milieux de culture - Dans le cas du poulet nous avons utilisé le milieu F10 de HAM ou le N.C.T.C. 109 contenant tous deux 10p.100 de sérum de veau foetal, 5 μ g/ml de taurine et 40 U/ml de pénicilline ou enfin, le milieu de HAM modifié par COON (82) (contenant quatre fois plus d'acides aminés, deux fois plus de vitamines et additionné de 1 g. de carbonate supplémentaire) et 5p.100 de sérum de veau foetal, pH 7,35.

Dans le cas des mammifères nous avons utilisé la modification de COON des milieux F10 et F12 de HAM contenant 5p.100 de sérum de veau foetal. Dans certaines expériences nous avons ajouté au milieu 5p.100 de sérum albumine bovine (fraction V de COON) et 0,1 p.100 de la fraction d'extrait embryonnaire de poulet de haut P.M. (préparée selon CAHN et COON). Certains milieux contenaient en outre 5mg/00 de taurine. Tous les milieux étaient additionnés de 100 U/ml de pénicilline, de 50 μ g/ml de streptomycine et parfois de 2 μ g/ml de fungisone.

Conditions de culture - Les cultures ont été conduites à 37°C dans de l'air contenant de 6 à 7 p.100 de CO₂. Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Petri en falcon (Falcon tissue culture dishes n° 3002) de 60 mm contenant 3 ml de milieu préalablement équilibré à 37°C dans cette atmosphère. Trois jours après l'ensemencement on ajoute 2 ml de milieu neuf. Par la suite on procède à un changement de milieu tous les 3 jours mais en prenant soin de n'opérer qu'un renouvellement partiel du milieu usagé tant que les cellules n'ont pas atteint un nombre suffisant.

Ces milieux sont filtrés sous pression à travers des filtres Millipore HA et GS préalablement déchargés de leur détergent (Triton X) par de l'eau bidistillée bouillante.

Culture pure d'hépatocytes de lapin - Huit jours après l'ensemencement primaire des boîtes de Pétri avec 10^3 à 10^4 cellules, nous avons repéré au microscope inversé à contraste de phase les colonies d'allure parenchymateuse que nous avons cerclé à l'aide d'un objectif marqueur (MARKI LEITZ). Le milieu est alors remplacé par une solution Saline G sans Ca^{++} ni Mg^{++} qui réduit l'adhérence des cellules au substrat. Les plages cerclées sont détachées sous stéréomicroscope à l'aide d'une spatule en teigon. Les petits amas cellulaires flottant dans la solution sont prélevés avec une pipette de SPEEMAN et transportés dans une boîte de Pétri contenant 3 ml de milieu équilibré. Au bout de 24 heures certains de ces amas se sont attachés à la surface du récipient de culture et donnent naissance à des colonies.

Technique de repiquage - Après enlèvement du milieu les cultures sont rincées avec une solution de saline G sans Ca^{++} ni Mg^{++} puis incubées à $37^{\circ}C$ dans cette même solution contenant 0,1p.100 de trypsine pH 7,6. On poursuit le traitement jusqu'à ce que les cellules encore attachées au récipient soient séparées ou reliées entre elles par quelques fins prolongements. La solution de trypsine est éliminée, la culture rincée par 8 ml de milieu complet. On ajoute enfin 5 ml de milieu et les cellules sont détachées mécaniquement par un jet de pipette. La suspension cellulaire est distribuée dans des milieux neufs. Nous avons pu, grâce à cet artifice éviter toute centrifugation.

Technique de clonage - Le clonage des hépatocytes de rat a été effectué selon la technique de PUCK à partir d'une culture primaire. Le clone choisi est repéré par cerclage et isolé du reste de la culture par la pose d'un petit cylindre en porcelaine ("penicylinder") et ses cellules détachées par la trypsine selon la technique décrite plus haut.

Analyse des résultats - Après des temps variables de culture en présence de cholate ou de désoxycholate marqués les explants hépatiques et le milieu pour les cultures organotypiques, le milieu seul pour les cultures cellulaires sont précipités par l'éthanol en présence d'acides biliaires entraîneurs.

Les extraits alcooliques sont chromatographiés sur couche mince de silicagel G selon la technique exposée plus haut.

Ces chromatogrammes permettent la détection éventuelle des produits de conjugaison du cholate ou du désoxycholate marqués par autoradiographie avec un film Kodirex (15 jours de pose) et par passage éventuel au "Scanner". Une partie aliquote des extraits alcooliques, étendue de son volume d'eau et acidifiée, est employée à la séparation du cholate et du taurocholate marqués en vue d'un comptage. Le cholate radioactif est extrait sélectivement à contre courant par l'éther éthylique avec addition réitérée de cholate froid entraîneur. Le taurocholate reste dans la phase aqueuse. On procède aux comptages de la radioactivité par examen de prises aliquotes des deux phases avec notre compteur à méthane.

2)- RESULTATS EXPERIMENTAUX -

A)- CULTURES ORGANOTYPIQUES -

Les explants prélevés du 7ème au 14ème jour d'incubation conservent au moins 5 jours la faculté de conjuguer la taurine au cholate traceur ajouté aux cultures, ceci même dans du Parker 199 pur. 100 mg d'explants de 14 jours conjuguent jusqu'à 60 p.100 des 2 μ curies/ml de cholate ajouté au milieu. Ces 2 μ curies correspondent à 56 μ g de cholate, compte tenu de l'activité spécifique.

Les expériences ont été conduites de la façon suivante:

- les explants sont séparés en deux moitiés que l'on transporte l'une directement dans du milieu chaud, l'autre dans du milieu froid. Au bout d'un temps variable, (de 1 à 5 jours) on bloque l'expérience pour la première moitié et transplante les explants de la seconde dans un milieu radioactif pour une période équivalente. Nous nous sommes assurés que le foie en culture était bien responsable de la conjugaison au cours d'expériences témoins où nous avons préalablement tué les explants par la chaleur.

Le pourcentage de conjugaison du cholate est sensiblement proportionnel au temps de contact des explants avec le milieu contenant le cholate traceur.

B)- CULTURES CELLULAIRES -

1)- Cellules hépatiques d'embryons de Poulet -

Observations morphologiques - A partir de foie embryonnaire de 12 à 14 jours, avec des inoculats suffisamment importants, nous avons pu obtenir des cultures primaires où l'on distinguait des plages d'hépatocytes bien caractéristiques, séparées par des groupes de cellules d'allure fibroblastique. Les îlots d'hépatocytes semblent provenir en partie de la réaggrégation des cellules parenchymateuses à la surface des récipients de culture, en partie de la multiplication des cellules ainsi regroupées. Mais les fibroblastes envahissent rapidement la culture et "étouffent" les îlots parenchymateux.

Les essais de clonage, effectués soit par ensemencement primaire d'un petit nombre de cellules isolées (technique de PUCK), soit par ensemencement secondaire d'hépatocytes obtenus par trypsination de groupes parenchymateux primaires prélevés à l'aide

d'une micro-spatule, se sont soldées par un échec. Les cellules restent isolées, ne forment pas de clones, s'étalent largement à la surface des récipients sur laquelle elles glissent au hasard, perdent leur caractère parenchymateux et dégénèrent.

Observations biochimiques - Des cultures primaires de 72 heures laissées pendant 48 heures au contact du cholate marqué et de la taurine ajoutés au milieu, sont encore capables de former du taurocholate. Mais l'impossibilité de purifier les cultures par clonage nous a conduit à l'étude du foie de mammifère.

2)- Cellules hépatiques de Mammifères -

a)- Cellules hépatiques du lapin

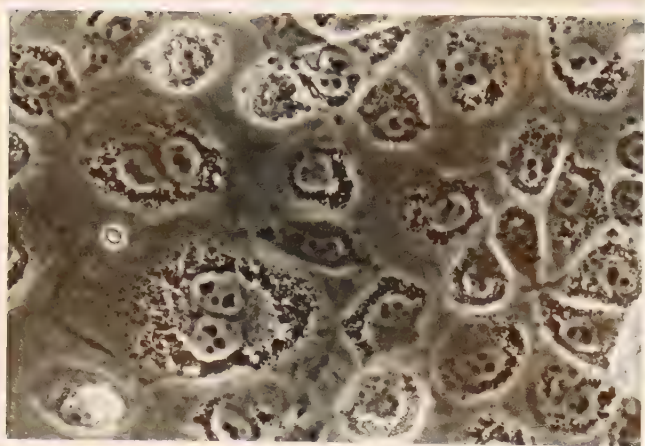
Observations morphologiques - La mise en culture primaire - à des dilutions aptes au clonage - de foie de lapereaux âgés de 8 à 12 jours, a conduit à l'obtention de colonies d'allure épithéliale

- FIGURE n° 11 -

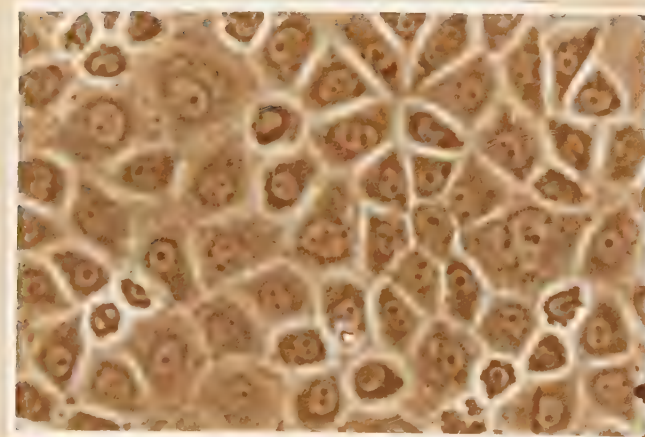
et de colonies fibroblastiques. Nous avons pu prélever à l'aide d'une micro-spatule quelques clones d'allure épithéliale et obtenir ainsi des cultures secondaires pures de cellules dont l'aspect indique l'origine parenchymateuse.

Ces cellules examinées vivantes en contraste de phase sont de deux types selon la nature du milieu. Le type A est constitué de cellules polygonales, denses, brillantes, dont le cytoplasme est bourré de petites inclusions sphériques. Le type C présente également des cellules polygonales, mais leur apparence est terne et leur cytoplasme pratiquement dénué de granulations. Le noyau sphérique, régulier, pourvu de deux nucléoles, est analogue dans les deux cas ; les cellules binucléées sont fréquentes.

- FIGURE n° 11 -



Culture secondaire de Lapin forme A



Culture primaire de Lapin forme C

Les cellules A adhèrent plus fortement entre elles qu'à la surface du récipient de culture : il est aisé d'en prélever un clone in toto à l'aide d'une micro-spatule de teigon sans léser de cellule. Au contraire les cellules C adhèrent plus fortement à la surface de matière plastique, sont plus fragiles et il est difficile de détacher, ne serait-ce que des fragments de clone, sans en déchirer un grand nombre. Le transfert d'un clone de type C au milieu A conduit, en 24-48 heures, à la transformation de l'aspect morphologique : les cellules se chargent de granules et prennent l'allure A. L'ensemencement d'un clone C dans le milieu C préserve la morphologie C. Le remplacement du milieu A par le milieu C conduit à la perte rapide des inclusions et l'épithélium prend l'aspect plat et terne caractéristique du type C. Les deux milieux contiennent du sérum de veau foetal ; le facteur responsable semble être la présence, dans le milieu A, de sérum de lapin. Dans les deux milieux, les cellules se multiplient et restent saines. Il semble que les granules soient identiques aux inclusions contenant 90p.100 de triglycérides que MACKENZIE (83) avait antérieurement décrites dans des cultures de foie de lapin cultivées en présence de sérum iso-spécifique.

Les cellules polygonales ont d'abord gardé en culture secondaire le caractère parenchymateux qu'elles avaient au départ. Mais après une quinzaine de jours, de nombreuses colonies ont changé d'allure dans la plupart des récipients : les cellules se sont allongées plus ou moins parallèlement entre elles, leur grand axe s'orientant radiairement à la périphérie des clones ; à certains endroits les cellules ont formé plusieurs couches juxtaposées (transformation ?). Les cellules ont été repiquées après trypsinisation et ont alors donné naissance à des groupes de morphologie très variée : cellules parenchymateuses typiques, cellules géantes Les cultures n'ont pas été conservées.

Observations biochimiques - De l'acide désoxycholique 24^{14}C libre, ajouté aux cultures secondaires purifiées, n'a pas donné lieu à la synthèse d'acides biliaires conjugués.

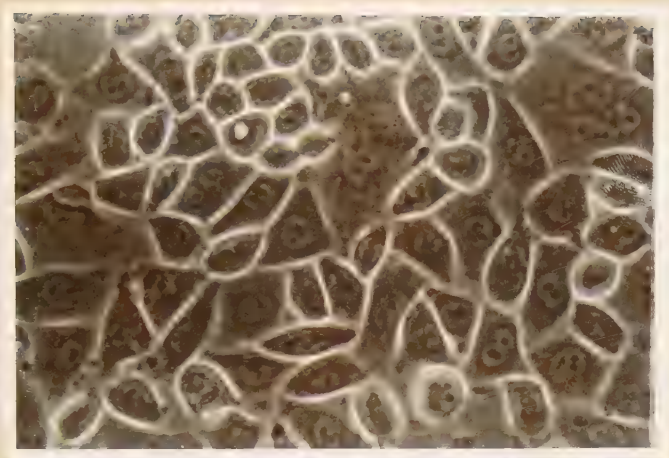
b)- Cellules hépatiques de rat

Observations morphologiques - La mise en culture primaire (à des dilutions aptes au clonage : 10^3 à 10^4 cellules dans 5ml de milieu) de foie de rats de 3 à 11 jours a permis d'obtenir des clones parenchymateux à raison de 1 à 3 pour mille cellulesensemencées. A côté de ces clones, apparaissent également des colonies fibroblastiques moins nombreuses, semble-t-il, en présence de sérum de lapin.

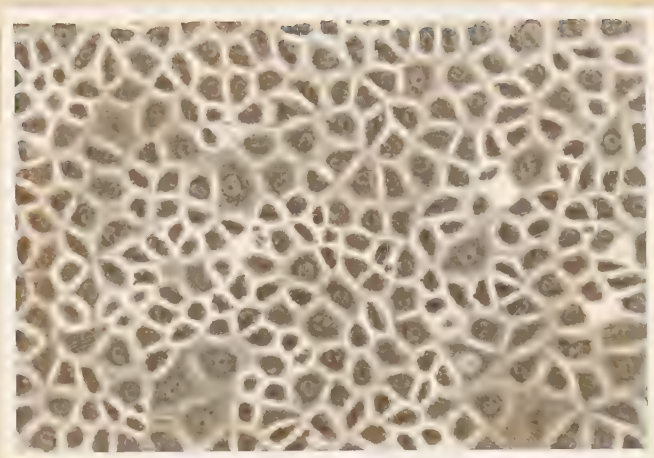
- FIGURE n° 12 -

Les cellules parenchymateuses de rat, comme celles du lapin, passent de la forme C à la forme A et vice-versa selon la nature du milieu. L'effet serait moins net et le milieu à sérum de lapin semblerait légèrement toxique. Il n'y a pas eu transformation des cellules en prolongeant le temps de multiplication in vitro et nous avons isolé, en septembre 1968, à partir de cultures pures de cellules parenchymateuses obtenues par trypsinisation élective de clones appropriés, un clone encore en culture actuellement (clone A 6). Le clone est sélectionné au microscope à contraste de phase puis on le repère d'un cercle tracé sur la boîte en plastique avec l'objectif marqueur. La boîte est transportée sur une surface noire, sous la hotte stérile, et, à l'aide d'un pénicylinder on isole le clone du reste de la culture pour procéder électivement à sa trypsinisation.

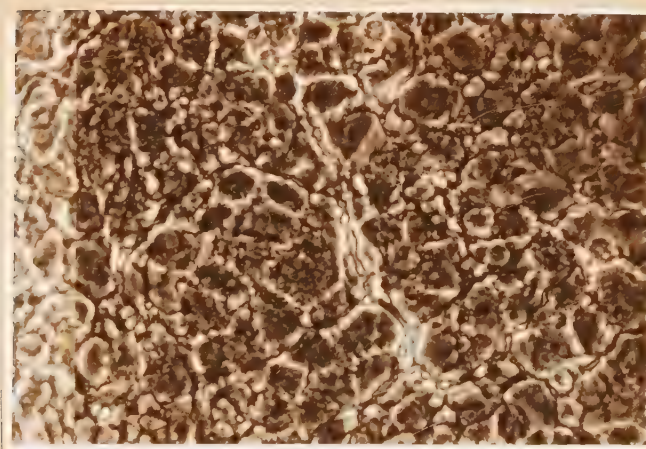
- FIGURE n° 12 -



Foie de Rat. Clone A 6



Foie de Rat. Clone A



Clone A. présence de fibrilles.

Les clones parenchymateux se présentent comme une plage de cellules polygonales régulièrement juxtaposées ; la périphérie comporte plus fréquemment des cellules plurinucléées ou des cellules mononucléées de grandes dimensions dont le noyau présente plus de deux nucléoles. La région centrale de ces colonies présente au bout de quelque temps un aspect caractéristique : les cellules sont petites, serrées, denses, régulières, parfois disposées en rosette et il se dépose entre elles de fins faisceaux de fibrilles irrégulièrement parallèles, longues, sinueuses, bien visibles en contraste de phase, qui forment tout un réticule entre et par-dessus les cellules. Ces fibrilles laissent souvent entre elles de petites lacunes contournées qui semblent contenir une matière moins dense que les fibrilles elles-mêmes. Ce lacis se dissout sous l'action de la trypsine. Son aspect au contraste de phase est identique au réseau de "réticuline" que l'imprégnation argentique permet de mettre en évidence entre les cellules endothéliales et les cellules parenchymateuses du foie de rat prélevé in vivo. La morphologie des cellules est stable ; le repiquage et le clonage selon la technique de PUCK permettent d'obtenir des clones "mixtes " identiques et aussi des clones de cellules de plus grandes dimensions, moins denses, toutes analogues aux cellules de la périphérie et sans doute issues d'elles. Il semblerait qu'un clone "mixte " puisse donner naissance aux deux types de clones, mais que les clones à grandes cellules, qui souvent végètent et se multiplient très lentement, ne puissent donner que des clones à grandes cellules. Il s'agirait peut être de variations de la ploïdie. Aussi avons-nous récemment recloné le clone A 6.

Observations biochimiques - De l'Acide désoxycholique 24^{14}C a été ajouté au milieu de culture afin de rechercher son éventuelle conjugaison à la glycine ou à la taurine. L'examen autoradiographique des chromatogrammes en couche mince réalisés à partir des extraits correspondant à ces diverses cultures n'a pu déceler dans aucun cas la formation de tauroconjugués.

C)- DISCUSSION -

Les essais effectués avec le foie d'embryon de poulet ont montré que ce tissu conserve pendant quelques jours en culture organotypique la faculté de conjuguer l'acide cholique à la taurine. La présence d'hormones d'origine sérique n'est donc pas nécessaire.

Les cultures primaires de l'ensemble des cellules hépatiques du Poulet après trypsinisation ("monolayer") conjuguent encore l'acide cholique à la taurine au bout de trois jours. Les quelques expériences effectuées avec ce système montrent que la structure histologique du foie n'est pas indispensable à la conjugaison des acides biliaires in vitro.

Par contre le clone isolé à partir de cellules hépatiques de jeune raton tout comme les colonies homogènes obtenues à partir des cellules hépatiques du jeune lapereau se sont révélées incapables de conjuguer l'acide désoxycholique à la taurine ou à la glycine et, dans le cas du rat, d'hydroxyler l'acide désoxycholique en acide cholique. Cette incapacité constatée après plusieurs semaines de culture, peut s'expliquer de deux façons: les cellules hépatiques que nous avons isolées ne sont pas des hépatocytes et n'ont jamais pu métaboliser les acides biliaires - ou bien il s'agit de cellules parenchymateuses qui ont perdu en culture cette faculté.

Origine des cellules en culture -

ALEXANDER et GRISHAM (84) à partir d'explants de foie de raton de 1 et 5 jours, cultivés dans une atmosphère O_2/CO_2 95/5, observent la croissance d'une nappe cellulaire présentant

trois types de cellules épithéliales. Les cellules du premier type ont un cytoplasme pratiquement sans structure à l'exception d'une zone de granulations perinucléaires. Le noyau typiquement oval contient un ou plusieurs petites nucléoles irrégulières et le microscope électronique met en évidence l'existence de "Tight junctions" reliant les cellules les unes aux autres. Les cellules de l'épithélium granulaire au contraire, montrent en microscopie de phase, un cytoplasme granulaire dense, un noyau rond contenant un gros nucléole unique.

Enfin quelques cultures contiennent des excroissances en forme de tubules de 30 à 80 μ de diamètre qui semblent représenter les canalicules biliaires. La microscopie électronique montre également l'existence de complexes de jonction au niveau de la membrane de ces deux dernières catégories cellulaires.

Les auteurs attribuent une origine mésoendothéliale ou cellules du premier type et, en s'appuyant sur leurs observations morphologiques et biochimiques (présence du glycogène, de la glucose-6-phosphatase et de l'adénosine tri-phosphatase), ils concluent à l'origine parenchymateuse des cellules du second type. Sur la vue des photographies publiées, il est difficile de ranger nos cellules dans l'une ou l'autre de ces catégories.

Dans une autre publication, BOREK et coll. (85) ont étudié les communications intercellulaires des cellules hépatiques en culture. Ils ont utilisé des cellules hépatiques, obtenues à partir de rat de un mois selon le procédé de COON, (86,87) purifiées à trois reprises par clonage et une lignée de cellules hépatiques de rat fournie par KAIGHN. Nous avons pu comparer nos cellules à celles cultivées par COON et par KAIGHN : elles sont en tous points morphologiquement identiques. Elles forment toutes le lacis extracellulaire que nous avons décrit plus haut. KAIGHN, aux dires de

BOREK et coll., a montré par radio-immunoélectrophorèse que ces cellules synthétisaient des protéines sériques ; il s'agirait d'après eux d'une lignée d'hépatocytes. Nous ne pouvons, quant à nous, affirmer que nos cellules sont bien des hépatocytes. Il nous appartiendra de préciser leur nature par des tests biochimiques-spécifiques. Lorsque nous aurons la certitude de disposer d'hépatocytes nous constaterons que nos cellules clonées conservent leur différenciation ou bien la perdent et , dans ce dernier cas, seules les cellules venant d'être mises en culture primaire fourniront un test positif.

- Perspective de travail -

Nous disposons pour les hépatocytes d'un certain nombre de tests biochimiques spécifiques. Nous nous proposons d'utiliser:

- la sécrétion de la serum albumine et dans le cas du tissu foetal, celle de l' α foetoprotéine,
- les antigènes de surface,
- l'accumulation du glycogène.

Nous reprendrons bien entendu la conjugaison des acides biliaires à la taurine test qui s'est révélé négatif dans nos conditions expérimentales précédentes.

Nous nous trouverons devant le problème suivant :

- les hépatocytes clonés conservent leur différenciation.

Nous pourrions tenter de moduler, de déclencher et d'inhiber les activités enzymatiques correspondant au test retenu.

- les hépatocytes clonés perdent leur différenciation

Nous essayerons :

- a)- d'établir la chronologie de la perte des fonctions hépatiques après la mise en culture,
- b)- d'empêcher cette "différenciation" des cellules qui a peut être lieu, dès la culture primaire,
- c)- de rendre aux cellules clonées la faculté d'exprimer leur différenciation au cas où la perte de l'épiphénotype ne serait pas irréversible.

*

* *

*

- R E S U M E -
=====

Au cours de notre introduction nous faisons le point des données actuelles sur les acides biliaires chez l'animal adulte :

- Etapes métaboliques de la transformation du cholestérol en acides biliaires, nature, mode de conjugaison et répartition zoologique des acides biliaires, rôle physiologique (cycle entéro-hépatique et flore intestinale). Nous passons ensuite en revue les notions fragmentaires que nous possédons sur le cholestérol et les acides biliaires au cours de la vie embryonnaire.

Nous estimons qu'une étude plus approfondie des acides biliaires chez l'embryon mérite d'être entreprise :

- Outre les résultats d'ordre biochimique (le volet terminal du catabolisme du cholestérol) elle pouvait apporter des données sur l'évolution physiologique du système digestif au cours de la vie foetale. Enfin sur le plan de la différenciation cellulaire, la transformation du cholestérol en acides biliaires et la conjugaison de ces derniers avec la taurine ou la glycine constituent un test spécifique de la maturation de l'hépatocyte.

Dans la première partie, nous apportons des précisions sur la date d'apparition et la nature des acides biliaires au cours de la vie foetale du rat, du lapin, du porc, du cobaye et chez l'embryon de poulet; nous étudions l'évolution des acides biliaires chez le rat, le lapin et le poulet et celle de leur précurseur, le cholestérol hépatique. Nous montrons dans le cas du lapin et probablement aussi du porc, qu'une part importante des acides biliaires foetaux provient de l'organisme maternel. Nous avons enfin déterminé
chez l'embryon

de poulet in ovo, la date d'apparition de la conjugaison des acides biliaires à la taurine.

1)- Nous révisons les méthodes d'extinction, de détection et de dosages des acides biliaires en insistant particulièrement sur le dosage après séparation chromatographique que nous avons longuement mis au point. Nous passons en revue les autres méthodes utilisées : dosage du cholestérol, techniques de détermination des activités enzymatiques responsables de la conjugaison in ovo de l'acide cholique à la taurine, techniques isotopiques etc...

2)- Les acides biliaires peuvent être détectés au 19ème jour de la vie foetale du rat, au 22ème jour de celle du lapin, entre le 55ème et le 65ème jour de celle du porc, entre le 45 et le 50ème jour de la vie intra-utérine du cobaye. Ils apparaissent au 11ème jour d'incubation chez l'embryon de poulet.

3)- On retrouve avant la naissance ou l'éclosion les acides biliaires principaux de l'âge adulte : acide taurocholique chez le rat, acides glycocholique et glycodésoxycholique chez le lapin, acides hyocholique, hyodésoxycholique, chénodésoxycholique et cholique conjugués à la glycine et à la taurine chez le porc, acide chénodésoxycholique (forme de conjugaison non précisée) chez le cobaye, acides taurochénodésoxycholique et taurocholique chez le poulet. Chez le fœtus de lapin l'acide glycocholique est plus abondant que l'acide glycodésoxycholique contrairement au cas des acides biliaires du cycle entéro-hépatique du lapin adulte où prédomine l'acide désoxycholique, produit par la flore digestive à partir de l'acide cholique originel.

Aucune trace d'acide biliaire libre n'a pu être décelée. Tout le cholate marqué injecté à l'embryon de poulet se retrouve sous forme tauroconjuguée. Les activités enzymatiques assurant la conjugaison des acides biliaires apparaissent, in ovo,

40) Le 60e jour d'incubation.

4)- Le cholestérol 14 -C injecté dans le vitellus de l'oeuf de poulet incubé est transféré au foie embryonnaire ; l'isotope se retrouve dans tous les acides biliaires de l'embryon. L'acide désoxycholique de la bile du foetus de lapin provient de la circulation entéro-hépatique de la femelle gestante. Au 27ème jour cet acide d'origine maternelle constitue près de la moitié des acides biliaires foetaux. Le passage transplacentaire des acides biliaires dans le sens mère-foetus a pu être démontré par l'administration de cholestérol marqué à la lapine et détection de la radioactivité dans l'acide désoxycholique foetal. L'origine maternelle de l'acide hyodésoxycholique excrété par le foetus de porc est probable.

5)- Dans les espèces étudiées, les acides biliaires augmentent brutalement avant la naissance ou lors de l'éclosion (X25 chez le rat, X12 chez le lapin, X6 chez le poulet). Cette évolution ne coïncide pas avec une variation analogue du cholestérol précurseur. Elle pourrait être due à une augmentation prénatale de l'activité des systèmes enzymatiques transformant le cholestérol en acides biliaires conjugués. Chez le poulet, elle explique en partie la chute du cholestérol hépatique et de la taurine qui suit l'éclosion.

Dans la deuxième partie nous examinons dans quelle mesure une des réactions étudiées in vivo (la conjugaison des acides biliaires à la taurine) qui constitue un test de la maturation de la cellule hépatique, pourrait être utilisée, chez le poulet, comme marqueur spécifique de l'hépatocyte cultivé in vitro. La manifestation précoce de cette activité enzymatique in ovo rendait peu probable la possibilité de la faire apparaître de novo en culture,

même avec du tissu hépatique prélevé tout au début de l'histogénèse. Compte tenu de l'accroissement brutal de la formation et de la conjugaison des acides biliaires au moment de la naissance, il était cependant permis d'espérer moduler ces activités in vitro.

Nous avons d'abord cherché si du tissu hépatique isolé de l'organisme conservait, en culture organotypique dans un milieu synthétique, la possibilité de conjuguer les acides biliaires. Nous avons ensuite abordé les cultures cellulaires après trypsinisation. Nos cultures organotypiques et nos premières cultures cellulaires ont porté sur le foie d'embryon de poulet. Nous avons tenté de purifier ces cultures cellulaires par des essais de clonage qui se sont révélés impossibles avec ce matériel expérimental. Nous avons alors utilisé le foie de jeune lapereau à partir duquel nous avons obtenu une culture pure d'apparence parenchymateuse puis le foie de raton nouveau-né qui nous a permis d'isoler en 1968 un clone d'hépatocytes dont la culture se poursuit aujourd'hui.

A)- CULTURES ORGANOTYPIQUES -

Les explants prélevés du 7ème au 14ème jour d'incubation conservent au moins 5 jours la faculté de conjuguer la taurocholate traceur ajouté aux cultures, ceci même dans du Parker 199 pur. 100 mg d'explants de 14 jours conjuguent jusqu'à 60 p.100 des 2µcuries/ml de cholate ajouté au milieu. Ce qui, vu l'activité spécifique, correspond à 56 µg de cholate.

B)- CULTURES CELLULAIRES -

1)- Cellules hépatiques d'embryons de poulet.

- Observations morphologiques . A partir de foie embryonnaire de 12 à 14 jours, nous avons pu obtenir des cultures primaires où

l'on distinguait les plages d'hépatocytes bien caractéristiques, séparées par des groupes de cellules d'allure fibroblastique. Les fibroblastes envahissent rapidement la culture et "étouffent" les flots parenchymateux et les essais de clonage se sont soldés par un échec.

- Observations biochimiques - Des cultures primaires de 72 heures laissées pendant 48 heures au contact du cholate marqué et de la taurine ajoutés au milieu, sont encore capables de former du taurocholate. Mais l'impossibilité de purifier les cultures par clonage nous a conduit à l'étude du foie de mammifère.

2)- Cellules hépatiques de mammifères.

a)- Cellules hépatiques du lapin

- Observations morphologiques - Les cultures secondaires obtenues à partir de clones d'allure épithéliale sont de deux types selon la nature du milieu (A et C, tous deux constitués de cellules polygonales: présence ou absence d'inclusions). Le facteur responsable semble être le sérum de lapin dans le milieu A.

- Observations biochimiques - De l'acide désoxycholique 24^{14}C libre ajouté aux cultures secondaires purifiées, n'a pas donné lieu à la synthèse d'acides biliaires conjugués.

b)- Cellules hépatiques de rat

- Observations morphologiques - La mise en culture primaire a permis d'obtenir des clones parenchymateux. Les cellules parenchymateuses de rat, comme celles du lapin passent de la forme C à la forme A et vice-versa selon la nature du milieu. Nous avons isolé, en septembre 1968, à partir de cultures pures de cellules parenchymateuses obtenues par trypsinisation élective de clones appropriés, un clone encore en culture actuellement.

- Observations biochimiques - De l'acide désoxycholique 24^{14}C a été ajouté au milieu de culture afin de rechercher son éventuelle conjugaison à la glycine ou à la taurine. Nous n'avons pu déceler dans aucun cas la formation de conjugués.

*

* *

*

Des essais effectués avec le foie d'embryon de poulet ont montré que ce tissu conserve pendant quelques jours, en culture organotypique la faculté de conjuguer l'acide cholique à la taurine. La présence d'hormones d'origine sérique n'est donc pas nécessaire.

Les cultures primaires de l'ensemble des cellules du tissu hépatique après trypsinisation ("monolayer") conjuguent encore l'acide cholique à la taurine au bout de trois jours. La structure histologique du foie n'est pas indispensable à la conjugaison des acides biliaires in vitro.

Par contre le clone isolé à partir de cellules hépatiques de jeune raton tout comme les colonies homogènes obtenues à partir des cellules hépatiques du jeune lapereau se sont révélées incapables de conjuguer l'acide désoxycholique à la taurine ou à la glycine et, dans le cas du rat, d'hydroxyler l'acide désoxycholique en acide cholique. Cette incapacité constatée après plusieurs semaines de culture, peut s'expliquer de deux façons : les cellules hépatiques que nous avons isolées ne sont pas des hépatocytes (ce qui nous paraît peu probable) et n'ont jamais pu métaboliser les acides biliaires - ou bien il s'agit de cellules parenchymateuses qui ont perdu en culture cette faculté. Nous examinons cette alternative ;

Lorsque nous aurons la certitude de posséder des hépatocytes en culture, nous nous proposerons d'étudier la chronologie de cette dédifférenciation éventuelle et d'essayer de la prévenir, nous pourrions tenter de rendre aux cellules clonées la faculté d'exprimer leur différenciation au cas où la perte de l'épiphénotype ne serait pas irréversible.

*

* *

*

- B I B L I O G R A P H I E -
=====

1)- S. BERGSTROM and H. DANIELSSON -

Mechanisms of bile acid formation.
Congrès de Biochimie, Tokyo, 1967.

2)- I. BJORKHEM -

Role of Δ^4 3 α hydroxy sterols in the biosynthesis
of bile acid.
Acta Chem. Scand., 21, 2561-4 (1967).

3)- I. BJORKHEM and H. DANIELSSON -

Formation and metabolism of some Δ^4 cholestenols in
the rat.
Eur. J. Biochem., 2(4), 403-13 (1967).

4)- S. BERGSTROM et U. GLOOR -

Metabolism of bile acids in rat liver slices and
homogenates.
Acta Chem. Scand., 8, 1373 (1954).

5)- S. BERGSTROM et U. GLOOR -

Metabolism of bile acids in liver slices and
homogenates.
Acta Chem. Scand., 8, 1109 (1954).

6)- S. BREMER -

Thèses . Akadem. Trykingssentral Blindern, Oslo (1956).

7)- T. SCHERSTERN -

The synthetis of cholic acid conjugates in human
liver.
Acta Chem. Scand. (1967).

8)- G.A.D. HASLEWOOD -

Recent developments in our knowledge of bile salts.
Physiol. Rev., 35, 178, (1955).

9)- A. NORMAN -

On the conjugasion of bile acids in the rat.
Acta Physiol. Scand., 32, 1 (1954).

10)- A. NORMAN -

Acta Chem. Scand., 8, 1098 (1954).

11)- A. NORMAN -

Acta Physiol.Scand., 33, 99, (1955).

12)- M. LAMBIOTTE -

Influence de la nature des lipides alimentaires sur
le métabolisme du cholestérol chez le rat adulte.
Thèse, 1963.

13)- B.E. GUSTAFSSON, S. BERGSTROM, S. LINDSTEDT et A. NORMAN -

Proc.soc.exptl.Biol.Med., 94, 467, (1957)

14)- S. BERGSTROM, S. LINDSTEDT, B. SAMUELSON -

J. Biol.Chem., 8, 34, (1959).

15)- J.SJÖVALL et I. ÅKESSON -

Intestinal absorption of taurocholic acid in the
rat.

Acta Physiol.Scand., 34, 273 , (1955).

16)- S. BERGSTROM, H. DANIELSSON et U. GLOOR -

Studies on the regulation of bile acid formation in
bile fistula rats.

Acta Chem.Scand., 10, 1056 , (1956).

17)- A. PIHL -

The effects of bile acids on cholesterol absorption
and synthesis in the rat.

Acta Physiol.Scand., 34, 206, (1955).

18)- O.W. PORTMAN, G.V. MANN et A.P. WYSOCKI -

Bile acids excretion in the rat. Nutritional effects.
Arch.Biochem.Biophys., 59, 224, (1955).

19)- L.L. ABELL, E.H. MOSBACH et F.E. KENDALL -

Cholesterol metabolism in the dog.

J.Biol.Chem., 220, 527, (1956).

20)- D.F. MAGEE, K.S. KIM et A.C. IVY -

Dietary factors influencing output of bile acids. Role of amino-acids.

Am.J.Physiol., 169, 317, (1952).

21)- S. BERGSTROM et ERIKSSON -

Acta Physiol.Scand. (1956).

22)- W.M. STOCKES, W.A. FISH and F.C. HICKAY -

Metabolism of cholesterol in the chick embryo. The synthesis of cholestérol.

J. Biol.Chem., 200, 683-9, (1953).

23)- P.W. CAMERINO and L.D. WRIGHT -

The biosynthesis of cholesterol in the developing chick embryo.

J. Lipids Res., 3, 426, (1962).

24)- J. NEEDHAM -

Chemical embryology.

Hofner Publ.Co., 1218-1228 et 1236-1255, (1963).

25)- F.I. TSUJI, M. BRIN and H. WILLIAMS -

Lipid phosphones and cholesterol changes in the hen's egg during incubation.

Arch.Biochem.Biophys., 56, 290, (1955).

26)- T. CAHN et A. BONOT -

Recherches de physiologie générale sur les variations des équilibres des constantes cellulaires au cours du développement embryonnaire et du jeûne.

Douin, 1928.

27)- F.W. ENTENMAN, LORENZ, J.C. CHAIKOFF -

The lipid content of blood, liver and yolk of the nearly hatched chick and the changes that occur in these tissues during the first month of life.

J.Biol.Chem., 133, 231, (1940).

28)- A.N. DAVISON, J. DOBLING, R.S. MORGAN and G. WRIGHT -

The deposition and disposal of ^{14}C -cholesterol in
the brain of the growing chick.
J. Neurochemistry, 3, 91-94, (1958).

29)- A. DESBROSSE-LOUP -

Variations des lipides du plasma et du foie chez le
jeune oiseau.
Thèse de Spécialité, Toulouse, (1965).

30)- B. LECLERCQ -

Contribution à l'étude du métabolisme des lipides
chez l'embryon de poulet : utilisation des réserves
vitellines en présence d'acide élaïdique dans l'oeuf
par la poule pondeuse.
Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., (1966).

31)- G. POPJACK and M.L. BEECKMANS -

Biochem. J., 46, 547, (1950).

et

G. POPJACK - Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol., 19, 200,
(1954).

32)- W.M. GOLDWATER and D. STENTEN -

Studies in foetal metabolism.
J. Biol. Chem., 169, 723, (1947).

33)- F. CHEVALLIER -

Transfert et synthèse du cholestérol chez le rat au
cours de sa croissance.
Biochim. Biophys. Acta, 84, 316-339, (1964).

34)- W.M. GOLDWATER and D. STETTEN -

Studies in foetal metabolism.
J. Biol. Chem., 169, 723, (1947).

35)- C.A. WILLIE, D.D. HAGERMAN -

American Journal of Physiol., 194, 457, (1958).

36)- T.R. CAHN, J. HOUGET -

Le transport des métabolites au cours de la gestation
de la lapine.

J. Physiologie, 47, 835-848, (1955).

37)- ROMANOFF. -

The Avian embryo.

38)- R.J. O'CONNOR -

J. Embryol. Exper. Morphol., 1, 165, (1955).

39)- A.J. DALTON -

The functional differentiation of the hepatic cells
of the chick embryo.

Anat. Rec., 68, 393, (1937).

40)- M.W. WHITEHOUSE; H.C. COTTREL, T. BRIGGS and E. STRAPLE -

Arch. Biochem. Biophys., 98, 305, (1962).

41)- H. DANIELSSON -

Presents status of research on catabolism and excretion
of cholesterol.

In Adv. in Lipid. Res., Vol 1, p.335, Paoletti and
Kritchevsky Ed., Acad. Press, (1963).

42)- H. DANIELSSON and RUTTER -

The metabolism of bile acid in the developing rat
liver.

Biochem., 7, 316-52, (1968).

43)- G.A.D. HASLEWOOD -

Bile Salts

Metheren and Co. London (1967)

44)- D.R. SAUNDERS et A.M. DAWSON -

Biochemical Problems of Lipids.

A.C. FRAZER - Amsterdam (1963).

- 45)- L.K. KNOEBEL et J.M. RYAN -
A.M. Journ. Physiol., 204, 509 (1963)
- 46)- A. WINDAUS et A. Van SHOOR -
Hoppe-Seyle Z., 161, 143 (1926).
- 47)- P. ENEROTH -
Thin-Layer chromatography of bile acids.
J. Lipid Res., 4, 11 (1963)
- 48)- D. KRITCHEVSKY -
Detection of bile acids in thin-layer chromatography.
Anal. Biochem., 5, 388-392 (1963).
- 49)- B. FROSC, H. WAGNER, J. KLIN -
Zür quantitativen dünschichtchromatographischen
Bestimmung freier gallensäuren.
Z. Klin. Chem., 2, 7 (1964).
- 50)- R. GREGORY et T.A. PASCOE -
J. Biol. Chem., 83, 35 (1929).
- 51)- L. THIVOLLE et WEISKOPF -
Trav. Membres Soc. Chim. Biol., 25, 1305 (1943).
- 52)- S. ERIKSSON, J. SJOVALL -
The absorption spectre of bile acids in sulfuric
acid. Bils acids and steroids.
31 Arkiv. för Kemi. Band 8 ur 28.
- 53)- GANSHIRT, KOSS, MARIANZ -
Arzein Mittelforsch., 10, 943 (1963).
- 54)- J.L. IRVIN, D.B. JOHNSTON et J. KOPALA -
J. Biol. Chem., 153 (1944).
- 55)- T. SHIMADA -
J. Biochem. Japan, 28, 149 (1938).
- 56)- W.C. SCHNEIDER -
J. Biol. Chem., 161, 293 (1945).

57)- S. BERGSTROM, H. DANIELSSON and A. GORANSSON -

Acta.Chem.Scand., 13, 776, (1959).

58)- K. HELLSTROM and J. SJOVALL -

Turnover of deoxycholic in the rabbit.
J. Lipid.Res., 3, 397, (1962).

59)- J.W. WILSON, C.S. GROAT and E.M. LEDUC -

Histogenesis of the liver.
Ann. N.Y.Acad.Sci., 111, 8, (1963).

60)- V.B. PETERS, G.W. KELLY and H.M. DEMBITZER -

Cytologie changes in foetal and neonatal hepatic cells of the mouse.
Ann. N.Y. Acad.Sci., 111, (1963).

61)- R.L. JACQUOT -

Proc.second.Int.Congress Endocrinol. Excerpta medica
Int.Congress series n° 83, 790, (1964).
Hormones and liver metabolism in the foetus.

62)- I.T. OLIVER, W.F.C. BLUMER and I.J. WITHAM -

Free ribosomes during maturation of rat liver.
Comp.Biochem.Physiol., 10, 33-38, (1963).

63)- P. FAVARD et A. JOST -

Différenciation et charge en glycogène de l'hépatocyte du foetus du rat normal ou décapité.
Arch.Anat.Microsc.Morph.exp., 55, 39, (1966).

64)- R. JACQUOT -

J. Physiol.(Paris), 51, 655, (1959).

65)- A. JOST -

Harvey Lectures, séries 55, 201 (Ac.Press, 1961)

66)- G.D. SORENSON -

Hepatic hematocytogenesis in the foetal rabbit :
a light and electron microscopic study.
Ann. N.Y.Acad.Sci., 111, 45, (1963).

67)- J. PAUL -

The role of foetal hormones in prenatal development
in differentiation.
Ciba found.Symp., p.90 et 91 (Churchill, 1967).

68)- T.H. SHEPARD -

in Organogenesis De Haan et Ursprung ed.p.493.
Holt, Hinchart and Winston, 1965.

69)- R.W. BRAUER, M.J. LOGAN and J.S. KREBS.-

Maturation of liver function in the chick embryo
as explored with S³⁵ sulfobromophthalein vascular fac-
tors biliary secretion and conjugation.
Ann. N.Y. Acad.Sci., 111, 136, (1963).

70)- P.G. TONER -

Development of the acid secretory potential in the
chick embryo proventriculus.
J.Anat., 99, 389, (1965).

71)- T.A.I. GRINDLE -

The ontogeny of insulin secretion in the chick embryo.
J. Endocrinol., 22, 285, (1961).

72)- R.D. CAHN -

in Stability of differentiated State, Beerman, Reinert
and Ursprung ed. (Springer Verlag, 1968, sous presse).

73)- N. LE DOUARIN -

Etudes expérimentales de l'organogenèse du tube di-
gestif et du foie chez l'embryon de poulet.
Bull.Biol.Fr.Belg., 98, 543-583 et 589-676, (1964).

74)- F. MOOG -

The biochemistry of animal development.
Vol.1 p.307. R. Weber ed.Acad.Press,(1965).

75)- A.M. NEMETH -

Initiation of enzyme formation by birth.
Ann. N.Y. Acad.Sci., 111,199,(1963).

76)- M.J.R. DAWKINS -

Glycogen synthesis and breakdown in fetal and new-born rat liver.

77)- H. BURCH -

Biochemical changes in perinatal rat liver.
Ann. N.Y. Acad.Sci.,111,(1963).

78)- J. GUERRIC et C. CADET -

- travaux non publiés.

79)- Lipid Metabolism in cultured tissue cells Wistar

80)- E. WOLFF et K. HAFFEN -

Tex.Rep.Med.Biol.,10,463(1952)

81)- O.A. TROWELL -

Exptl.Cell Res.,6,246(1954).

82)- H. COON et M. WEISS -

P.N.A.S.,62,852(1969).

83)- C.G. MACKENZIE, J.B. MACKENZIE et O.K. REISS -

in Lipid metabolism in tissue culture cells,
Wistar Inst.Symp. n° 6 p.63-83 (1967).

84)- ALEXANDER et GRISHAM -

Explant culture of rat Liver Laboratory Investigation, 22, 50 (1970)

85)- C. BOREK, S. HIGASHINO and W.R. LOEWENSTEIN -

Intercellular Communication and tissue growth.
J. Membrane Biol.,1,274-293 (1969).

86)- H.G. COON -

Journal Cell Biol., 39. 29a. (1968).
==

87)- COON H.G. -

Carnegie Institution of Washington . Year Book,
67, 411, (1968).

* *

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES
DE PARIS

9, QUAI SAINT BERNARD - PARIS V*

SERVICE DE LA SCOLARITÉ

Bureau des Enseignements du 3^e Cycle

TÉLÉPHONE : 336-25-25 - P

PERMIS D'IMPRIMER

DOCTORAT : D'ÉTAT

THESE DE : ES SCIENCES NATURELLES

Nom : CROIZAT

Prénoms : Bernard

Né (e) le 21 Septembre 1933 à Paris Dép^t Seine

SUJETS

1^{ère} THESE : "Les acides biliaires au cours de la vie embryonnaire et
néonatale:

étude in vivo et in vitro.

2^e THESE (Propositions faites par la Faculté) :

Vu et approuvé

Paris, le 31 Décembre 1970

Le Doyen de la Faculté
des Sciences de Paris

Vu et permis d'imprimer

Paris, le

Le Recteur de l'Académie
de Paris



Signature

